



TITLE:

MAPキナーゼの細胞質 - 核間移行 の制御機構の解析(Dissertation_全 文)

AUTHOR(S):

足立, 誠

CITATION:

足立, 誠. MAPキナーゼの細胞質 - 核間移行の制御機構の解析. 京都大学,
2001, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2001-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3183053>

RIGHT:

MAPキナーゼの細胞質一核間移行の制御機構の解析

足立 誠

目次

要旨・・・3

序論・・・4

結果

1. MAPKの核移行の制御機構の解析

1-1 レプトマイシンBはMAPKの細胞質局在を阻害し、核移行を誘導する・・・12

1-2 MAPKKによるMAPKのチロシン残基のリン酸化がMAPKK-MAPK複合体の解離を引き起こす・・・12

1-3 MAPKのMAPKKからの解離がMAPKの核移行に必要である・・・14

1-4 MAPKの核移行はWGAやRanQ69Lで阻害されない・・・15

1-5 MAPKは単純拡散によって核に入ることができる・・・16

1-6 MAPKは能動輸送によって核移行され得る・・・17

1-7 MAPKのホモ二量体化がMAPKの能動輸送に必要である・・・18

2. MAPKの核外移行の制御機構の解析

2-1 核移行したMAPKの細胞質への再局在は核外移行によって行われる・・・19

2-2 LMBはMAPKの核外移行を阻害する・・・20

2-3 MAPKKは細胞質と核の間を常に往来している・・・20

2-4 MAPKKの核への微量注入によってMAPKの核外移行が促進される・・・21

2-5 MAPKの核外移行は核内におけるMAPKKとMAPKとの結合を妨げることで阻害される・・・22

図・・・23

考察・・・37

材料と方法・・・44

謝辞・・・48

参考文献・・・49

要旨

MAPキナーゼ(MAPK)は静止期細胞においては細胞質に局在するが、増殖因子などの様々な外界因子によって活性化すると、核へ移行する。またその後不活性化されるに伴い、再び細胞質へ局在を変化させる。これに対しMAPKの活性化因子であるMAPキナーゼキナーゼ(MAPKK)は、核外移行シグナル(nuclear export signal; NES)を持つために見かけ上は常に細胞質に局在する。静止期におけるMAPKの細胞質局在は、MAPKKがMAPKと直接結合し、MAPKの細胞質アンカーとして働いていることで実現しており、MAPKが核移行する時には両者の結合が解離することが知られている。

私はまずMAPKの核移行に伴うMAPKK-MAPK複合体の解離が、MAPKKによるMAPKの活性化に必要な二つのリン酸化部位の一つである、チロシン残基のリン酸化によって引き起こされることを明らかにした。また、MAPKが核内へ移行する過程において、独立した二つの機構、すなわち1)二量体分子のRan依存的な能動輸送、および2)単量体分子の単純拡散、が関与していることを見出した。

次に私は、MAPKが核から細胞質へ再局在する過程について、これは核内のMAPKをMAPKKがそのNESを用いて運び出すことで実現されているのではないかという仮説を立てた。そして、1)MAPKの核外への移行が、NES依存的な核外輸送の阻害剤であるレプトマイシンBによって阻害されること、2)見かけ上常に細胞質に局在しているMAPKKが実際は細胞質と核の間を常に往来していること、3)MAPKの核外移行が過剰量のMAPKKの存在下で促進されること、4)MAPKの核外移行はMAPKとMAPKKとの結合を阻害することで抑制されることを明らかにした。従って、MAPKの核外移行は、一過的に核内に移行したMAPKKが核内でMAPKと結合し、そのNESを用いてMAPKとともに細胞質へ移行することで実現していることが示唆された。

序論

MAPキナーゼ(mitogen-activated protein kinase; MAPK)は、1980年代後半に様々な細胞増殖因子によって共通に活性化されるセリン／スレオニンキナーゼとして同定された(Ray and Sturgill, 1987; Hoshi et al., 1988)。当時から、増殖刺激が細胞外から核内へどのように伝わって遺伝子発現を引き起こし、細胞の増殖へと導くのかについては強い関心が持たれていたが、このMAPKの発見が、その解明を進める糸口となった。すなわちその後の研究によって、まずMAPKの活性化がスレオニン残基とチロシン残基の両方のリン酸化によって引き起こされることが明らかになり(Ahn et al., 1991; Gomez and Cohen, 1991; Payne et al., 1991; Posada and Cooper, 1992)、これがMAPキナーゼキナーゼ(MAPK kinase; MAPKK)とよばれるセリン／スレオニン／チロシンキナーゼによって行われていることを見い出された(Kosako et al., 1992; Nakielnny et al., 1992; Seger et al., 1992)。さらにこのMAPKKの活性化もまたリン酸化に依存することが示され(二つのセリン残基のリン酸化)、MAPキナーゼキナーゼキナーゼ(MAPKK kinase; MAPKKK)の存在が明らかになった(Kosako et al., 1992; Matsuda et al., 1992)。すなわちここにおいてMAPKの活性化に至るMAPKKK-MAPKK-MAPKというキナーゼカスケード(MAPKカスケード)の存在が明らかになったのである。そして癌遺伝子産物であるRaf-1がMAPKKKとして機能することが見い出され(Dent et al., 1992; Howe et al., 1992; Kyriakis et al., 1992; Alessi et al., 1994)、またさらに癌遺伝子産物の低分子量GTP結合蛋白質RasがMAPKの活性化を引き起こすことが明らかになった(Hattori et al., 1992; Leivers and Marshall, 1992)。Raf-1はRasの下流に位置して機能することも見い出され(Kolch et al., 1991)、事実その後RasがRaf-1の活性化に直接寄与していることが示された(しかしその機構については未だ議論が続いている)(Koide et al., 1993; Zhang et al., 1993)。Ras自身の活性化についてもチロシンキナーゼ型受容体-Grb2-Sos-Rasという経路が明らかにされた(Simon et al., 1991; Margolis et al., 1992)。そして一方、MAPKが遺伝子発現に重要な機能を持つElk-1, c-Myc, c-Fos, c-Junなどの転写因子群を数多くin vitroで基質とすることが見い出され(Davis, 1993)、特にEtsファミリー

に属するElk-1をin vivoでリン酸化することで、増殖因子によるSRE(serum response element)からの転写を促すことが示された(Marais et al., 1993)。こうして早くも1990年代前半には増殖因子からMAPK、そして核内での遺伝子発現へと至る道筋＝シグナル伝達経路が解明されたのである。これが細胞外の刺激が核へ伝わる機構が明らかになった最初の例の一つであり、その意義は非常に大きいと言える（もちろんその後の研究によってさらに多くの分子の関与が見い出され、より複雑な制御が行われていることが明らかになっていることは言うまでもない）。

特記すべきは、この経路の解明において様々の異なった系、異なった手法を用いて研究が行われてきたことであり、事実、哺乳類培養細胞やアフリカツメガエル卵を用いた生化学的解析、および酵母やショウジョウバエ、線虫を用いた遺伝学的解析が互いを補うように並行して進められていたのである。そしてそれはとりも直さずMAPKの関与する生命現象が単なる増殖シグナルの伝達にとどまらない、多様なものであることを反映していると言え、そのことがさらにMAPKの重要性を広く認識させることになった(Sturgill and Wu, 1991; Thomas, 1992; Blenis, 1993; Nishida and Gotoh, 1993; Marshall, 1994; Robinson and Cobb, 1997; Lewis et al., 1998)。ここに現在までに明らかになっているMAPKの機能をいくつか挙げてみると、細胞周期でのG1/S期の進行の制御といった細胞増殖(Pages et al., 1993; Cowley et al., 1994; Lavoie et al., 1996)、脊椎動物の減数分裂の制御といった卵成熟(Kosako et al., 1994)、中胚葉誘導といった初期発生(Gotoh et al., 1995)、線虫の陰門形成あるいはショウジョウバエの複眼形成といった器官形成(Lackner et al., 1994; Wu and Han, 1994; Biggs 3rd et al., 1994)、PC12細胞のNGFによる神経様分化といった細胞分化(Cowley et al., 1994)、アポトーシスの抑制といった細胞生存(Xia et al., 1995)などのほか、最近ではシナプスの長期増強あるいは長期抑圧といった記憶や学習(English and Sweatt, 1996; Kornhauser and Greenberg, 1997)、または哺乳類での体内時計遺伝子の概日周期的な発現の制御(Akashi and Nishida, 2000)といった、より複雑で高度な事象への関与も知られている。そして今後の研究によってまださらに多くの機能が明らかにされていくであろうことは想像に難くない。

一方このような多様な機能を持つことが明らかとなったMAPKだが、ここに来て一つの疑問が出てくる。それは、細胞によるMAPKシグナルの応答の特異性は如何に制御されているのだろうか、ということである。言い換えれば、一細胞はMAPKという単一の分子にどのようにして多様な機能を持たせることができるのだろうか、そしてまたもしそのような機能を持たせる仕組みがあるならば、それらはどのように制御されているのだろうか？現在までにこの問いに答える事例がいくつか明らかにされている。

まず一つは、細胞によって異なる基質が発現しており、それによって細胞の応答が規定されるというものである。このような例の一つが線虫のMAPKカスケードの研究から明らかにされた。線虫ではMAPKカスケードは上述した陰門の形成のほか、個体の生存、雄の尾の形成、生殖細胞の成熟などへの関与が知られている(Lackner and Kim, 1998)。LIN-31はwinged-helixファミリーに属する転写因子で、in vitroで線虫のMAPKであるMPK-1の基質となり、また遺伝学的にもMPK-1の下流で働くことが明らかにされた。しかしながら、LIN-31の変異株は陰門の形成にのみ異常を示し、MPK-1の関与する他の現象での異常は示さなかった。またその発現部位は陰門の細胞を除いてはMPK-1の機能とは無関係な場所であった。すなわちLIN-31はMPK-1の陰門細胞のみにおける基質であり、陰門におけるMPK-1の機能の特異的に発揮させるための機能を持つと考えられる(Tan et al., 1998)。ただし、実際にはMAPKの基質として知られる分子の多くはほとんどの組織の細胞に発現しており、このようなモデルがどの程度一般性を持つかはわからない。

二つ目は、単一の細胞内でMAPK以外のシグナル伝達経路が同時に活性化され、その経路がシグナルの特異性を決めるというもの。実際、細胞を増殖因子などで刺激した時にはMAPKカスケードのみならず他の多くのシグナル経路が活性化することが知られている。また、生体内では細胞は一種類のみの刺激ではなくいくつもの刺激を一度に受けることを考えると、MAPKカスケードが他のシグナル経路と何らかの相互作用をすることは十分に考えられる。このような考えは”シグナルのクロストーク”として最近注目を浴びているが、いくつかの例も実際に見つかっている。例えば、エストロゲン受容体は転写制御因子であるが、その活性化はエストロゲンの受容のみでは十分には起こらず、

MAPKによるリン酸化を受けて初めて十分な活性化を起こす(Kato et al., 1995)。SRF(serum response factor)-Elk-1転写因子複合体による転写の活性化には、MAPKによるElk-1のリン酸化の他に低分子量GTP結合蛋白質の一種Rhoからのシグナルも必要である(Marais et al., 1993; Hill et al., 1995)。またTGF- β の下流で働くSMAD(SMAD1,2,3など)の活性化をMAPKのリン酸化が抑制することが知られている(Kretzschmar et al., 1997)。これらのモデルは一つ目のモデルと異なり、細胞そのものの差異を必要とせず、むしろ細胞外から受けるシグナルの違いによってその応答に特異性を生じさせることができる機構であると言えるだろう。したがって、多くのシグナル分子がほとんどの種類の細胞に発現していることを考えると、生体内においても比較的多くの細胞でこの機構を用いて特異性が作られていることが予想される。

三つ目は、活性化するMAPKの、活性化の程度の違いにより応答に差が生じる可能性。ここで言う”程度”は、一つの細胞内に存在するMAPK分子のうち何%が活性化状態になっているかという量的なもの(強度とよべる)と、MAPKの活性(細胞内のMAPK分子の総和についての活性)の持続する時間の長さについてのものとの二つを意味する。そしてこの両者の要素を共に内包するものとして、上述のPC12細胞の神経様分化の例が挙げられる。PC12細胞はNGFで刺激すると神経様細胞に分化するが、一方EGFによる刺激では細胞は増殖を促進されるが分化はしない。この両者の違いを生じさせる原因として、それぞれの刺激によるMAPKの活性化の程度の違いが決定的な役割を担っていることが明らかになった。すなわちNGFによるMAPKの活性化は長時間にわたり持続し、比較的強度も大きい、EGFでのMAPKの活性化は数分しか見られず一過的で、強度も小さかった。そして重要なことは、EGFによる刺激でも、強く与えることで神経様分化を引き起こせたことである(Traverse et al., 1994; Marshall, 1995)。なおこの場合、最終的にMAPKの活性の程度の差がどのような差異を産むのかは明らかにされていないが、NGFの場合とEGFの場合とで基質そのものに違いが無いと仮定できるなら、結局はMAPKのリン酸化する基質の量の問題に還元できるだろう。このような、活性の程度による特異化という機構はしかし、あまりこの他に例が知られておらず、生体内でどの位多く用い

られているかは不明である。たとえこのモデルを適用する例が他にあったとしても、それを実験的に証明するにはその系においてMAPKの活性が(他のシグナル伝達経路に依存せずに)直接表現型に繋がっている必要があることや、細胞へMAPKの活性化因子を恒常的に過剰発現させたり、不可逆的な阻害剤を用いた実験が多い中で、活性の強弱や持続時間といった観点は見過ごされがちであることが実証例の少ない原因として考えられる。

そして最後に、同一のMAPK分子であってもその活性化する細胞内の局在の違いによって特異性が生じるという考え方がある。これには、他の分子と異なる局在をとることで上流から異なる制御を受け得るという側面と、異なる基質を持ち得るという側面とがある。後者については上記の一つ目の例と類似しているが、異なるのはたとえ細胞内に存在する基質に差が無くとも、MAPK自身の細胞内の分布に差を作り出せれば、そこでMAPKの機能に特異性を持たせることが可能だという点である。

局在を利用している例を挙げると、哺乳類培養細胞において、体細胞分裂期の前期や中期を中心とした時期には、活性化したMAPKの動原体における局在が見られ、そこで何らかの基質をリン酸化することで細胞分裂期の進行に寄与しているとされている(動原体に局在するモーター蛋白質CENP-Eなどが基質の候補として挙げられている)(Shapiro et al., 1998; Zecevic et al., 1998)。また同様に、分裂期前中期に見られるゴルジ体の断片化にはMAPKの活性が必要であり、実際MAPKがゴルジ体に局在し、それらが機能を果たしているのではないかという報告がある(Acharya et al., 1998)。なおこのどちらの例においても、MAPKが何の刺激で活性化するかは知られていない。一方、比較的昔から知られていたことに、細胞を増殖因子で刺激したときにみられるMAPKの一過的な細胞質から核への局在の変化が挙げられる。すなわち、静止期(間期)の細胞においてMAPKは細胞質にのみ局在がみられるが、刺激によって活性化するとともに核への局在がみられたのである(Chen et al., 1992; Gonzalez et al., 1993; Lenormand et al., 1993)。静止期での細胞質局在は上流からのシグナルをMAPKKから受容するために必要なことである(MAPKKは見かけ上は常に細胞質にのみ局在している(後述))し、活性化とともに

核へ局在することもMAPKが核内の転写因子群を多く基質として持つことを考えれば必須である。そして留意すべきは、局在の差異を作る上で、あらかじめ特定の部位にMAPKの局在を限定させず、代わりに移行させる能力を持たせている点である。これにより、その制御さえ適切に行えれば、外界刺激に対しより柔軟にMAPKの機能を発揮させることができると思われる。なおこのような局在の規定あるいは移行を利用した例は、MAPKに限らず他のシグナル分子についても多く知られている。

このように見てくると、局在の変化が如何に制御されているかが重要になってくる。例えば上述したMAPKの間期における動原体やゴルジ体への局在は、おそらくそこにMAPKと相互作用（結合）する分子（例えばMAPKの基質そのもの）が存在するからだとして説明できるだろう。事実、MAPKはその基質の多くと結合できることが知られており、それはリン酸化反応を効率良く行うためにも役立っている(Yang et al., 1998; Gavin et al., 1999; Jacobs et al., 1999; Smith et al., 1999)。つまりMAPK分子が基本的に細胞内で動的であり、その運動を妨げるものが無いならば、MAPK分子が基質の存在する部位へ局在するのは十分に可能である。しかし一方、細胞質から核への移行に際しては核膜の通過が必要であるから、そこに何らかの輸送機構が関与しているはずである。

一般にタンパク質の細胞質一核間輸送は核膜上に多数散在する核膜孔を介して行われる。分子量が40-60kD以下の分子は単純拡散によって核膜孔を通過できるとされているが、それより大きな分子には能動輸送が必要となる。一般に能動輸送されるタンパク質は核移行シグナル(nuclear localization signal; NLS)あるいは核外移行シグナル(nuclear export signal; NES)とよばれるシグナル配列を持ち、これをそれぞれの受容体が認識することで核膜孔を通過できる。NLSは正に帯電したアミノ酸(ArgまたはLys)のクラスターから成る配列で、一方NESは四つの疎水性アミノ酸(主にLeu, Ile)が特定の間隔で並んだ配列である。そしてこれらの輸送過程では共に低分子量GTP結合蛋白質Ranが必要とされている(Nigg, 1997)。MAPKはしかし、その一次配列中にシグナル配列は見い出されず、その輸送機構については全く明らかにされていなかった。しかしここ数年の研究により、いくつかの手掛かりが得られてきた。

MAPKとは異なりMAPKKは、その活性化状態によらず常に見かけ上は細胞質に局在することが知られていたが(Lenormand et al., 1993; Zheng and Guan, 1994; Moriguchi et al., 1995)、これはMAPKKがそのN末端にNESを持つためであることが明らかにされた(Fukuda et al., 1996)。そしてMAPKKはMAPKと直接結合することができ、それにより静止期においてはMAPKは細胞質に留まっていられることが示唆された(Fukuda et al., 1997a)。すなわちMAPKKはMAPKの細胞質アンカーとして働くと考えられた。そしてMAPKが核へ移行するには両者の結合が解離する必要があると考えられ、実際にMAPKの核移行と相関して結合の解離が観察された(Fukuda et al., 1997a)。一方、培養細胞への変異型MAPKの過剰発現の実験から、MAPKのリン酸化やMAPKのキナーゼ活性はMAPKの核移行にそれぞれ必要でないと報告された(Lenormand et al., 1993; Gonzalez et al., 1993)。しかしその後MAPKはリン酸化されることでホモ二量体を形成し、そのことが何らかの機構により核移行の促進に寄与しているのではないかという報告が出され、リン酸化が何らかの意義を持つと考えられた(Khokhlatchev et al., 1998)。このことはMAPKKの活性化がMAPKの核移行に必要なかつ十分であるという報告とも合致していた(Fukuda et al., 1997a; Lenormand et al., 1998)。そしてまた、MAPK経路の活性化によって核内にMAPKを留める未知の物質（核アンカー）が合成され、その存在がMAPKの核への局在に必要であるという報告もなされた(Lenormand et al., 1998)。このように断片的な報告がいくつか出されてきたが、しかしMAPKの細胞質一核間の移行が実際にはどのように行われているのか、まだ明確に思い描くことはできないだろう。これらの実験事実を統一的に一つのモデルの中に組み込んで、その全体像を明らかにできるだろうか？そのためにはいくつか明らかにしなければならないことがあるだろう。

- ・細胞質アンカーであるMAPKKとMAPKとの結合はどのように制御されているのか
- ・核移行に際しMAPKはどのような機構で核膜孔を通過するのか
- ・MAPKのリン酸化状態とその局在との関係は
- ・MAPKの二量体形成の意義は何か
- ・核アンカーはMAPKの核局在とどう関係するのか

・MAPKは核移行した後どのように細胞質へ戻るのか

本研究において私はこれらの点を考慮しつつ、MAPKの細胞質－核間移行の制御機構について解析を行った。

結果

1. MAPKの核移行の制御機構の解析

1-1 レプトマイシンBはMAPKの細胞質局在を阻害し、核移行を誘導する

MAPKKの細胞質局在はそのNESによって規定される(Fukuda et al., 1996)。我々は以前MAPKの静止期における細胞質局在は、MAPKKのN末端にMAPKが結合することで実現しているということを示唆する結果を得た(Bardwell et al., 1996; Fukuda et al., 1997a)。このことをさらに検証するため、我々は静止期にあるA6細胞に、NES依存的な核外移行の阻害剤であるレプトマイシンB(LMB)(Fornerod et al., 1997; Fukuda et al., 1997b; Ossareh-Nazari et al., 1997; Wolff et al., 1997)を添加し、その効果を見た。その結果、LMB処理によりMAPKKは細胞質局在が阻害されて、核へも局在が見られた(図1B; Fukuda et al., 1997b)。そして同時にMAPKの核への局在も観察された(図1A)。同様の結果は他の細胞種(3Y1細胞)を用いても得られた(data not shown)。この結果はMAPKKがMAPKの細胞質アンカーとして働いていることを強く示唆する。

1-2 MAPKKによるMAPKのチロシン残基のリン酸化がMAPKK-MAPK複合体の解離を引き起こす

MAPKKはその活性化状態によらず見かけ上常に細胞質に局在するため(Lenormand et al., 1993; Zheng and Guan, 1994; Moriguchi et al., 1995)、MAPKが核移行する際には両者の結合の解離が必要であると考えられる。実際、MAPKの核移行の際にMAPKKとの解離が生じることが確認されている(Fukuda et al., 1997a)。そこで我々はこの結合の制御機構について解析を行った。以下の実験では、COS7細胞にHAタグを付加したMAPKKをMAPKと共に発現し、その細胞の懸濁液から抗HA抗体でHA-MAPKKを免疫沈降して、共沈するMAPKの存在の有無を抗MAPK抗体によるイムノブロッティングによって検討した。細胞に刺激を加えないときは、MAPKの野生型MAPKKとの共沈が見られた(図2A, lane 9)。

一方恒常的活性型変異型のRas(RasVal12)を共発現し、MAPKカスケードを活性化させたときには共沈するMAPKの量が激減した(図2A, lane 10)。ここで注意すべきは、MAPKはリン酸化を受けるとSDS-PAGE上でゲルシフトを生じるのだが、このときわずかに共沈が見られたMAPKは、活性化していないMAPKのみだったことである(図2A, lane 10)。一方、MAPKKはMAPKによってフィードバックリン酸化を受けることが知られていたが、その意義は不明であった(Gotoh et al., 1994)。そこでフィードバックリン酸化の結合に対する効果を検討するため、そのリン酸化部位(Thr388)に変異を導入したMAPKK(T388A MAPKK)を用いて同様の実験をしたところ、野生型MAPKKを用いた時と同様の結果が得られた(図2A, lane 11 および 12)。したがって、MAPKによるMAPKKのリン酸化は結合の制御とは無関係であると示唆された。しかし、次にMAPKKのMAPKKKによる活性化に必要なリン酸化部位(Ser218, Ser222)に変異を加えたMAPKK(S218A/S222A MAPKK)を用いたところ、RasVal12の存在下でもMAPKは解離することなくMAPKKと結合していることが見いだされた(図2A, lane 13 および 14)。そしてキナーゼ活性を消失させた変異型MAPKK(K97S MAPKK)でも同様にRasVal12の発現によって結合の解離を起こさなかった(data not shown)。この二種類のMAPKKは共にRasVal12によるMAPKの活性化を阻害するドミナントネガティブ型MAPKKとして働くことから(図2A, lane 7 および data not shown)、これらの結果はMAPKのリン酸化そのもの、あるいはリン酸化によって活性化したMAPKのキナーゼ活性のいずれかが結合の解離に必要であることを示唆している。このことは、活性型MAPKK(SDSE MAPKK; MAPKKKによる活性化に必要なリン酸化部位Ser218とSer222をそれぞれAspとGluに置換したもの)によって誘導されるMAPKの解離が、MAPK特異的なホスファターゼで細胞質に局在しているMKP-3(Muda et al., 1996)の共発現によって、部分的にはあるが抑制されることと一致する(図2B)。

そして次にMAPKのリン酸化が重要なのか、それともMAPKの活性が重要なのかを明らかにするために、様々なMAPK変異体を用いた実験を行った。すなわちMAPKKによる二つのリン酸化部位のうちの一つであるThr188を変異させたTA MAPK、同じくもう一方のリン酸化部位Tyr190を変異させたYF MAPK、そしてキナーゼ不能型であるK57R

MAPKの三種について、野生型MAPKKおよびSDSE MAPKKとの結合を検討した。まず、これら全ての変異型MAPKは野生型MAPKと同様に野生型MAPKKと結合することが見いだされた(図2C, lane 14,17,20 および 23)。しかしSDSE MAPKKを用いた場合、野生型MAPK、TA MAPK、K57R MAPKでは解離が見られたが、YF MAPKでは解離が見られなかった(図2C, lane 15,18,21 および 24)。したがって、MAPKのMAPKKからの解離にはMAPKの活性は必要でなく、MAPKのリン酸化そのもの、特にチロシン残基のリン酸化が必要であることが示唆された。なおこれら三種の変異型MAPKはいずれも同程度にMAPKの活性を抑制するので(data not shown)、この結果がこれらの変異型MAPKのMAPK活性への効果の差のためである可能性は否定できる。ただ正確を期すならば、ごく弱く残っているMAPKの活性が、解離に対して全く寄与しないと完全に言い切れないかもしれない。

次に、もしもMAPKのリン酸化がMAPKKとの解離に必要十分であるなら、MAPKはMAPKKからリン酸化を受けるとすぐにMAPKKから解離すると考えることができる。そこでMAPKK-MAPK複合体の状態をMAPKの活性化後時間を追って観察するために、MAPKKKの一種であるB-Rafを、エストロゲンの添加あるいは除去によって自在に活性化あるいは不活性化できるΔB-Raf:ER細胞(Pritchard et al., 1995)を用いることにした。すなわちΔB-Raf:ER細胞にβ-エストラジオールの拮抗阻害剤である4-ヒドロキシタモキシフェン(4-HT; 4-HTもこの細胞においてB-Rafを活性化する能力を有する)を添加後、時間を追って細胞懸濁液を調整し、免疫沈降を行った。その結果、4-HT添加後わずか5分ではほぼ100%のMAPKの活性化が生じ(図2D, lane 3)、同時にMAPKの解離が見られた(図2D, lane 9)。この結果はMAPKのリン酸化とそのMAPKKからの解離がほぼ同時に起こっていることを示しており、MAPKのリン酸化がMAPKK-MAPK複合体の解離に必要十分であるという我々の仮説と合致する。

1-3 MAPKのMAPKKからの解離がMAPKの核移行に必要である

もしMAPKKがMAPKのアンカーとして働くなら、両者の解離を阻害したときMAPKの核

移行もまた阻害されるはずである。そこで我々は図2Cで用いたMAPK変異体の核移行能を検討した。NIH3T3細胞に野生型MAPKをSDSE MAPKKと共に発現すると、MAPKは強く核へ濃縮した。T188A MAPKやK57R MAPKもまた核への局在が見られたが、しかしY190F MAPKは全く核への移行が見られなかった(図3A)。T188A MAPKやK57R MAPKがSDSE MAPKKから解離でき、Y190F MAPKが全く解離できなかったことから(図2C)、MAPKはMAPKKから解離することがその核移行に必要であることが示唆される。この結果をさらに検証するため、次に我々は内在性MAPKのリン酸化を阻害したときにそれが核移行に対しどのような影響を与えるかを検討した。CL100/MKP-1はMAPK特異的ホスファターゼの一種で通常は核に局在する(Alessi et al., 1993; Brondello et al., 1995)。我々はそこでHIV-1のRevの配列に由来したNES配列(Fischer et al., 1995)をCL100のN末端に付加し、発現したとき細胞質にのみ局在するようにしたNES-CL100のcDNAコンストラクトを作製し、細胞質でMAPKのリン酸化を阻害できるようにした。COS7細胞をTPAで刺激すると刺激後5分で内在性MAPKの核移行が見られる(図3B, TPA-)。このときCL100を過剰発現しておいても核移行が阻害されないが、NES-CL100の過剰発現では核移行が強く阻害された(図3B, TPA+)。このことから、MAPKの細胞質におけるリン酸化がその核移行に必要であることが示唆される。また同時に、核におけるMAPKのリン酸化は必ずしも核移行に必要でないことも示唆される。留意すべきは、これらの結果はMAPKのMAPKKからの解離がMAPKの核移行に必要であるという我々の考えるモデルと合致するが、このことはMAPKのリン酸化がこれ以外にもMAPKの核移行に対し何らかの機能を果たしているかもしれない可能性を除外するものではないということである。

1-4 MAPKの核移行はWGAやRanQ69Lで阻害されない

MAPKの分子量は42-44kDと比較的小さいので、核膜孔を単純拡散で通過し得るかもしれない。しかし、何らかの能動輸送機構が関与することも考えられる。そこで我々は内在性MAPKの核移行に対する、二種類の能動輸送の阻害剤の効果を検証することにした。WGAは核膜孔を構成する核膜孔複合体に結合し、NLS依存的な核移行を阻害する(Finlay

et al., 1987; Yoneda et al., 1987)。RanQ69Lは能動的核移行および核外移行に必要とされている低分子量GTP結合蛋白質RanのGTPase活性欠損型変異体で(Ren et al., 1993; Bischoff et al., 1994; Klebe et al., 1995)、シグナル配列に依存する全ての核移行および核外移行を阻害する(Dickmanns et al., 1996; Palacios et al., 1996; Izaurralde et al., 1997)。これらの阻害剤が確かにNLSの効果を阻害することは、BSAにNLS配列を結合させ、FITCラベルした輸送タンパク質(FITC-NLS-BSA)をマーカー(TRITC-BSA)と共にA6細胞の細胞質に微量注入したとき、コントロール(阻害剤無し)で見られるFITC-NLS-BSAの核移行が完全に阻害されることから確認された(図4B および data not shown)。しかしながら、WGAあるいはRanQ69Lの微量注入によって血清刺激依存的な内在性MAPKの核移行は阻害されなかった(図4A および 4B)。したがって、能動輸送機構はMAPKの核移行に必要でないのかもしれない。この点をさらに検証するため、両阻害剤のMAPKの核移行に対する効果を血清刺激後時間を追って検討することにした。その結果、WGAおよびRanQ69Lの微量注入は共にMAPKの核移行の速度を下げず、むしろ速めることが見いだされた(図4C)。この結果は以下のように解釈することができる。すなわち、これらの阻害剤は細胞質への微量注入によってRan依存的な核移行のみならず核外移行も阻害したので(data not shown)、NESによって細胞質に局在しているMAPKKもまたその細胞質局在が阻害され、核へ局在するようになると考えられる。したがって同時にMAPKKによって細胞質に留められているMAPKもまた、血清刺激非存在下でも核へ局在するようになる(図4C および data not shown)。そのような効果があるので、血清刺激時においてもMAPKの核移行は、阻害剤の存在時においてより促進されていると思われる。したがってこれらの結果を総合的に解釈すると、A6細胞における血清刺激依存的な内在性MAPKの核移行に対する能動的輸送機構の寄与は、あったとしても低いと考えられる。

1-5 MAPKは単純拡散によって核に入ることができる

上記の結果から判断すると、MAPKは単純拡散によって核へ入ることができる可能性がある。このことを確認するために、細胞を低温下に置いたり、あるいは細胞からATPを

除去することで、エネルギーを必要とする能動輸送を阻害したときにMAPKが核へ局在できるかを検討した。大腸菌に発現させて得られたMAPKの組み換えタンパク質を、3Y1細胞の細胞質に微量注入し、1時間後のMAPKの局在を観察した。その結果、弱くではあるが明らかにMAPKの核への局在が認められた(図5, Control)。この結果は、細胞に過剰発現させたときにはMAPKが血清刺激非存在下でも核局在し得るという報告と一致する(Lenormand et al., 1993; Fukuda et al., 1997a)。そして細胞を低温下に置くかあるいはATPを除去した場合にはより強くMAPKの核局在が見られた(図5, Cold および ATP depletion)。したがって、MAPKは単純拡散によって核へ移行する能力があると思われる。

低温下およびATP除去時により強く核局在が見られたことは、これらの処理によってMAPKKのNES依存的な細胞質局在もまた阻害されたためであると考えられる(data not shown)。

1-6 MAPKは能動輸送によって核移行され得る

能動的輸送機構の関与についてさらに検討するため、我々はMAPKのN末端にβ-ガラクトシダーゼ(β-gal)を付加したβ-gal-MAPKのcDNAコンストラクトを作製した。β-gal-MAPKは非常に大きな分子量を持つので(約160kD)、単純核散では核移行ができない。ここで、過剰発現したMAPKの核移行を刺激依存的に生じさせるために、再度ΔB-Raf:ER細胞を用いた。ΔB-Raf:ER細胞にHA-MAPKKと共に野生型MAPKあるいはβ-gal-MAPKを発現し、4-HTで刺激した。その結果驚くべきことに、β-gal-MAPKも刺激依存的に核移行し、しかもそれは野生型MAPKよりも素早く、またより強く核へ濃縮した(図6B および 6C)。したがって、MAPKは単純拡散だけでなく、能動輸送によっても核移行できることが示唆される。

そこで次にβ-gal-MAPKの核移行に対するWGAおよびRanQ69Lの効果を検討した。ΔB-Raf:ER細胞の核にHA-MAPKKの発現ベクターと野生型MAPKあるいはβ-gal-MAPKの発現ベクターを同時に微量注入し、4時間インキュベートして各タンパク質の発現を誘導した。そして再び同じ細胞の細胞質にWGAまたはRanQ69Lを微量注入し、すぐに

4-HTで刺激を行った。その結果、WGAおよびRanQ69Lは共にβ-gal-MAPKの核移行を完全に抑制した(図7)。したがって、Ran依存的な能動輸送機構がMAPKの核移行に関与することが示唆された。ところで、A6細胞およびΔB-Raf:ER細胞での血清刺激または4-HT刺激によるMAPKの核移行は、刺激後数時間経って最も強く誘導されるが(図4C および 6C)、3Y1細胞でのTPA刺激による核移行はわずか5分で最も顕著に観察される。興味深いことに、3Y1細胞でのこの素早いMAPKの核移行は、WGAによって部分的にはあるが顕著に抑制された(図4D)。したがって、ある場合には能動輸送機構が確かに関与し得ると思われる。以上の結果をまとめると、能動輸送機構は必ずしも常に必要という訳ではないが、内在性MAPKの核移行に寄与していることが示唆された。

1-7 MAPKのホモ二量体化がMAPKの能動輸送に必要である

Khokhlatchevらは、MAPKはリン酸化を受けることでホモ二量体を形成し、そのことが何らかの機序でMAPKの核移行の促進に寄与しているらしいと報告した(Khokhlatchev et al., 1998)。その中で彼らは、二量体形成が不能となる変異型MAPKを同時に報告した(H181E L4A MAPK; MAPKのHis181をGlu, Leu338,341,346,349をAlaにそれぞれ置換したもの)。そこで我々はこの変異型MAPKを作製し、その核移行について我々の実験系で検証した。まずMAPKKとの結合について検討したところ、H181E L4A MAPKは野生型MAPKと同様にMAPKKと結合し、またRasVal12による刺激に依存的に解離した(図2E)。したがって、MAPKKからの解離にはMAPKのリン酸化を必要とはするが(図2A-2D)、リン酸化によって誘導されるMAPKの二量体化は必要でないことが示唆された。またSDSE MAPKKとの共発現によってH181E L4A MAPKの核への濃縮が観察された(図3A)。したがって、ホモ二量体化はMAPKの核移行に必ずしも必要でないことが示唆される。次に、刺激依存的なH181E L4A MAPKの核移行を経時的に観察するために、ΔB-Raf:ER細胞を用いた。その結果、4-HT刺激によってH181E L4A MAPKの核移行が観察されたが、その速度は野生型MAPKよりも明らかに遅かった(図6A)。なお、この時のH181E L4A MAPKおよび野生型MAPKのリン酸化の経時変化には大きな差は見られなかった(data not shown)。

したがって、MAPKのホモ二量体化はMAPKの核移行を促進するために何らかの機能を持っていると考えられる。そこで次に我々はH181E L4A MAPKに β -ガラクトシダーゼを付加した β -gal-H181E L4A MAPKを作製し、 Δ B-Raf:ER細胞においてその核移行を検討した。興味深いことに、 β -gal-H181E L4A MAPKは4-HT刺激後も全く核移行できなかった(図6B および 6C)。したがって、MAPKの能動輸送による核移行にはMAPKのホモ二量体化が必要であることが示唆された。

以上の結果をまとめると、MAPKの核移行には二つの機構が関与しており、一方は二量体形成に依存しない、単量体分子の単純拡散による核移行で、もう一方はホモ二量体分子のRan依存的な能動的輸送機構による核移行である。

2. MAPKの核外移行の制御機構の解析

2-1 核移行したMAPKの細胞質への再局在は核外移行によって行われる

増殖因子刺激などで見られるMAPKの核移行は一過的なものであり、その後再び細胞質へ局在することが知られている。この細胞質への再局在は、核内のMAPKの核外移行によって行われるか、あるいは核内のMAPKは分解されて、代わりに新たに合成されたMAPKが細胞質へ局在することで実現するか、どちらかの可能性が考えられる。この点を検討するために、蛋白質合成阻害剤であるシクロヘキシミド(CHX)の効果を検証した。A6細胞において、MAPKの核移行は血清刺激後4時間で最も強く誘導される(図8b)。その後血清を除去すると、10分で再び細胞質へMAPKの局在が見られる(図8c)。そこで、A6細胞に血清刺激後4時間でCHXを加え、10分間インキュベートした。その後血清を除去し、さらにCHX存在下で10分間インキュベートして内在性MAPKの局在を観察した。その結果、MAPKはCHX存在下でも細胞質へ再局在していた(図8d)。したがって、MAPKの核から細胞質への再局在は核外移行によって行われていることが明らかになった。

2-2 LMBはMAPKの核外移行を阻害する

次に、NES依存的な核外移行の阻害剤であるLMBの効果を検討した。3Y1細胞において、MAPKはTPA刺激後5分で核移行し、刺激後10分で細胞質へ核外移行する(図9, TPA)。そこでLMBをTPA刺激後5分で添加したところ、10分目における核外移行が強く阻害されていた(図9, TPA+LMB)。同様の結果は、A6細胞を用いた場合にも得られた(data not shown)。したがって、MAPKの核外移行はNES依存的な輸送機構を介して行われていることが示唆された。

2-3 MAPKKは細胞質と核の間を常に往来している

MAPK自身はNES様の配列を持っていないため、我々はNESを持つ他のタンパク質がMAPKを核から細胞質へ運び出すのではないかと考えた。MAPKKはそのN末端にNESを持ち、またMAPKに特異的に結合することが明らかになっている。そこでMAPKKがこの役を担っているのではないかと仮説を立てた。

ところで、このような機能を発揮するにはMAPKKは少なくとも一過的に核へ移行できなければならないが、しかしながらこれまでの報告ではMAPKKは見かけ上は常に細胞質に局在するとされていた。そこでMAPKKが本当に核へ移行し得るのかを検討する目的で、我々は以下のような実験を行った。血清飢餓により静止期にある3Y1細胞の核にHA-MAPKKの発現ベクターを微量注入により導入した。またこのとき、同時に抗HA抗体も微量注入した。そして5あるいは16時間後、微量注入した抗HA抗体の細胞内局在を同定した。この実験はすなわち、発現ベクター導入により発現させたHAタグ付きのMAPKKは、見かけ上は細胞質に局在しているが、もし一過的にでも核内に入り得るならば、核に微量注入した抗HA抗体と核内で結合し、複合体を作ることによって抗HA抗体を細胞質へ運び出すのではないかと考えて行ったものである。その結果、HA-MAPKKのベクターと抗HA抗体を用いたときのみ微量注入した抗体の細胞質局在が観察され、空ベクターや非免疫のコントロール抗体を用いたときは抗体は核内に留まったままだった(図10A および 10B)。したがって、MAPKKは常に細胞質に留まっている訳ではなく、核との間を常に往来していることが示唆された。なおこの実験系において、抗体の細胞質

への局在が十分に観察されるようになるまでに比較的長い時間が掛かっているが、これはおそらく微量注入した発現ベクターからHA-MAPKKが発現するのに比較的長時間を要すること(約4時間以上)と、微量注入した抗体の量が多いためであると思われる。実際、細胞をLMB処理したときには約10分でMAPKKの核への局在が見え始めることから(Fukuda et al., 1997b)、MAPKKはかなり素早く核との間を往来していると考えられる。

JaaroらおよびTolwinskiらは、ある種の変異型MAPKK(NESおよびリン酸化部位に変異を導入したもの)を細胞に過剰発現して増殖因子で刺激すると核へ集積すること、しかし野生型のMAPKKでは、このような刺激依存的な核移行は生じてはいるが、おそらくNESがあるために観察できないと考えられる、と報告した(Jaaro et al., 1997; Tolwinski et al., 1999)。もしこのような刺激依存的なMAPKKの核移行の機構が存在するならば、我々の示したモデルとも矛盾しない。そこで、このような刺激依存的なMAPKKの核移行は野生型MAPKKであっても見られるものなのか、またその移行は能動的輸送機構を介したものなのか、について調べるために、 β -galをMAPKKのN末端に付加した β -gal-MAPKKのcDNAコンストラクトを作製し、その細胞内局在を検討した。すなわち、 Δ B-Raf:ER細胞にHA-MAPKKあるいはHA- β -gal-MAPKKをMAPKと共に発現し、LMB存在下あるいは非存在下で4-HTによる刺激を加え、その局在の変化を調べた。その結果、LMB非存在下では4-HT刺激を加えても野生型MAPKKの細胞内局在に変化は見られないこと、また β -gal-MAPKKはLMB存在下で4-HTを加えても局在を変化させないことが見出された(図10C)。したがって、刺激依存的なMAPKKの核移行は、もし実際に生じているのだとしても、能動的輸送機構を介したものではないことが示唆される。

2-4 MAPKKの核への微量注入によってMAPKの核外移行が促進される

もしMAPKKがMAPKを核外へ連れ出す機能を持つならば、過剰量のMAPKKが核内に存在することによってMAPKの核外移行は促進されることが考えられる。この点を検証するために、3Y1細胞の核にMAPKの組み換えタンパク質を単独で、あるいはMAPKKの組み換えタンパク質と共に微量注入し、その5分後の細胞内局在を観察した。その結果、まず

単独で微量注入した場合、MAPKは核内に留まっていた(図11, Control)。一方、MAPKKと共に微量注入した場合、MAPKの核外への移行が著しく促進された(図11, His-WT MAPKK)。そして重要なことに、NESを変異させたMAPKKを微量注入しても全くMAPKの核外移行は促進されなかった(図11, His-LA MAPKK)。これらの結果より、MAPKKはそのNESの活性を利用してMAPKを核から細胞質へ運び出すことができることが明らかになった。

2-5 MAPKの核外移行は核内におけるMAPKKとMAPKとの結合を妨げることで阻害される

もしMAPKKがMAPKの核外移行に必要とされるなら、核内における両者の結合を妨げることによってMAPKの核外移行を阻害することができると考えられる。核内での結合を阻害するために、我々はMAPKK上のMAPK結合部位のGST融合タンパク質(GST-KK 1-60 LA; MAPKKの1-60番までのアミノ酸残基のGST融合タンパク質で、配列中に含まれるNESには変異を導入している)を作製した。まずA6細胞を4時間血清刺激して内在性MAPKの核移行を誘導した上で、GST-KK 1-60 LAを核へ微量注入した。その後すぐに血清を除去し、10分後のMAPKの局在を観察した。その結果、GST-KK 1-60 LAの微量注入によって、コントロールのGSTの微量注入の場合と比較して有意にMAPKの核外移行が阻害された(図12A および 12B)。したがって、MAPK上のMAPKK結合部位と結合する他の分子がMAPKを運び出している可能性を排除はできないが、これらの結果はMAPKの核外移行がMAPKKを介して行われていることを強く示唆する。

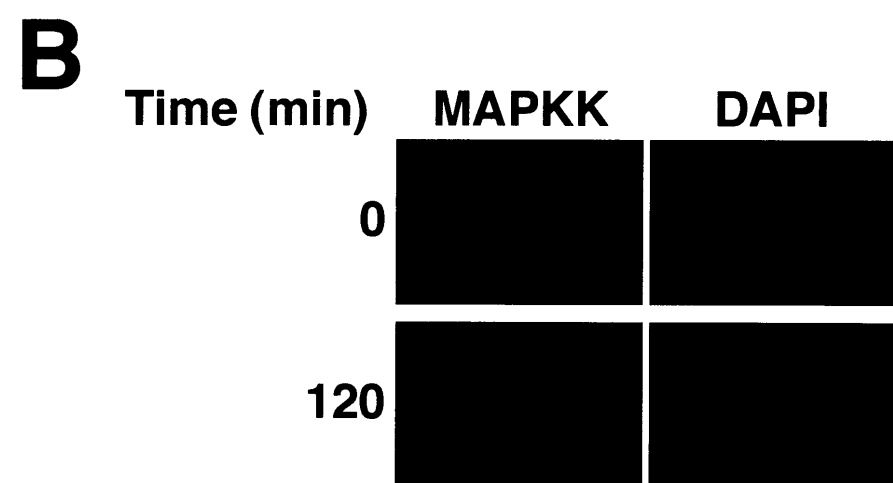
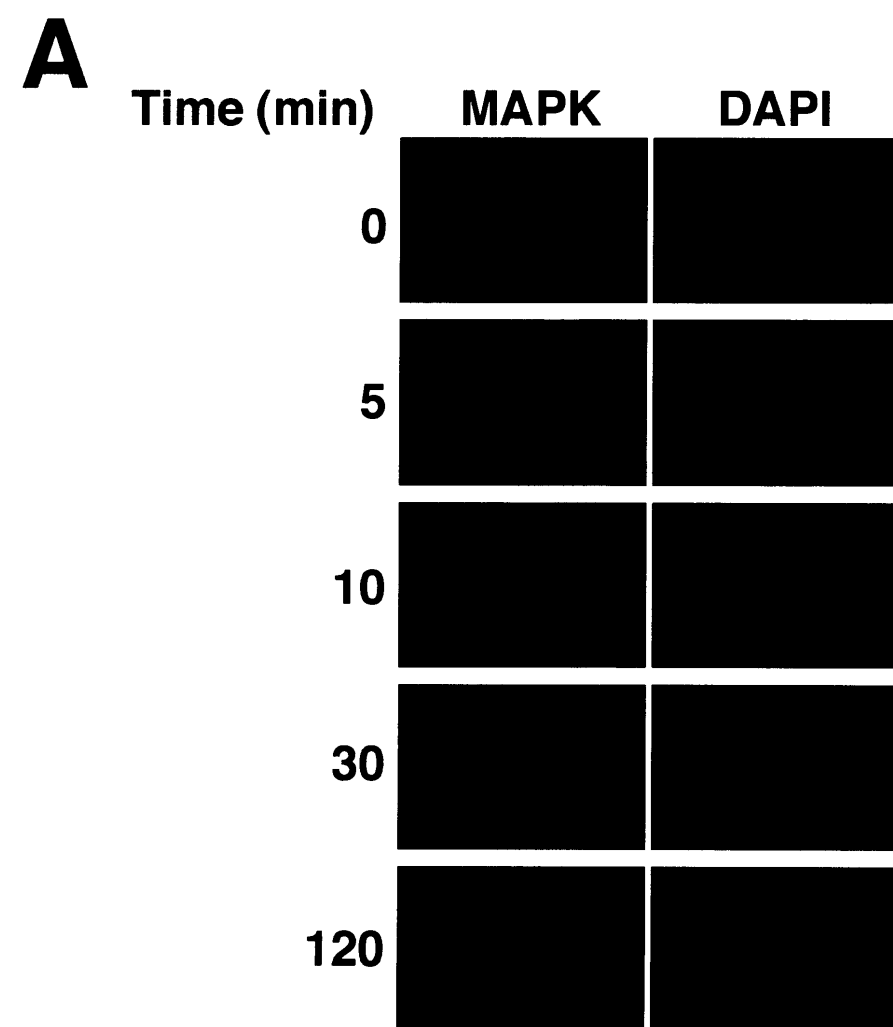


図1 LMBはMAPKの核移行を誘導する。(A) A6細胞を36時間血清除去し、LMB(8 ng/ml)を加えた。細胞を図に示した各時間後固定し、内在性MAPKの細胞内局在を抗アフリカツメガエルMAPK抗体による細胞染色で検出した。実験は3度行い、いずれでも同様の結果を得た。(B) A6細胞にHA-MAPKKをトランスフェクションし、24時間血清除去した。LMB(8 ng/ml)を加え、2時間後細胞を固定し、抗HA抗体による細胞染色を行った。

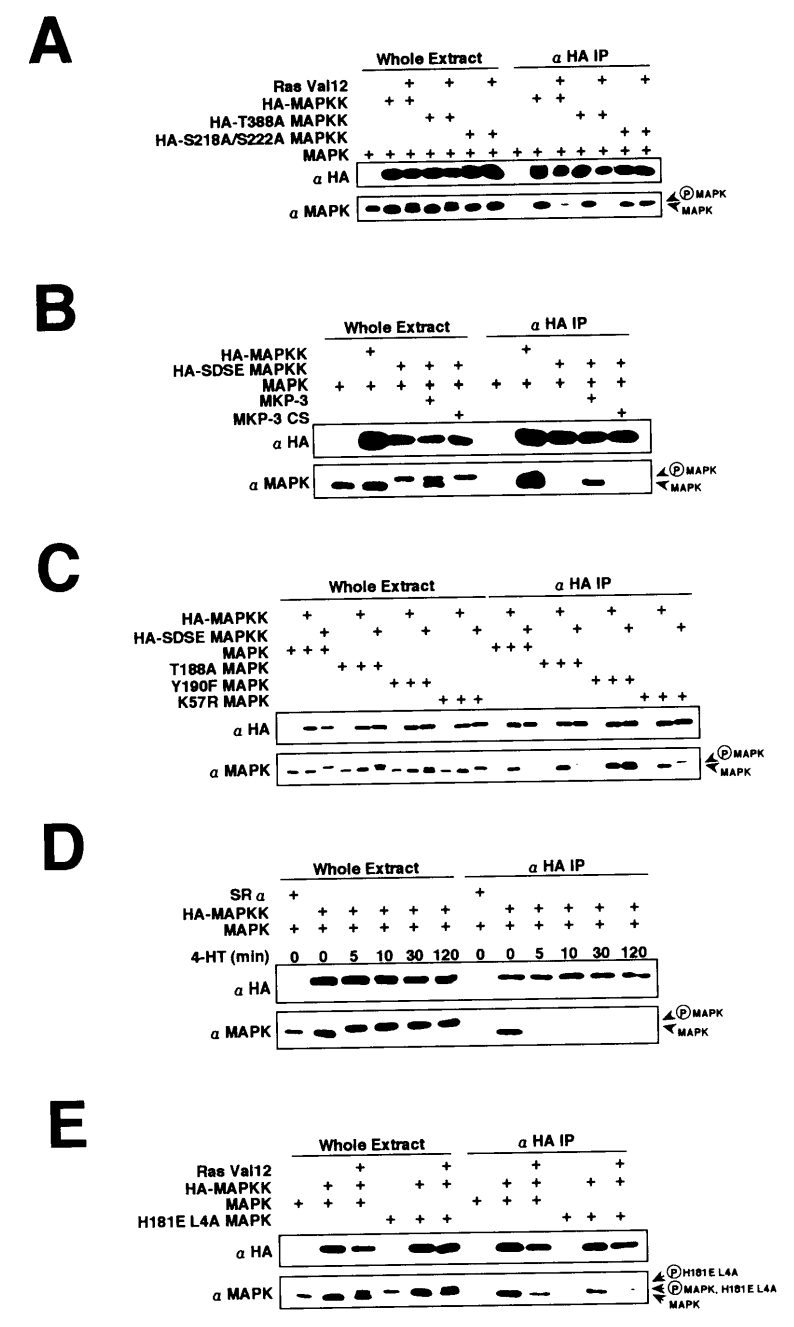


図2 MAPKのリン酸化がMAPKK-MAPK複合体の解離に必要十分である。(A) MAPKKへの変異導入の複合体解離への効果。COS7細胞にMAPKおよびHAタグを付加した各MAPKK変異体を、RasVal12と共に、あるいはそれらだけでトランスフェクションした。細胞懸濁液の一部はそのまま泳動した(Whole Extract)。残りは抗HA抗体による免疫沈降の後に泳動した(α HA IP)。そして抗HA抗体および抗MAPK抗体でイムノブロッティングを行った。(B) MKP-3の発現による複合体解離の部分的な抑制。COS7細胞に図に示した各コンストラクトをトランスフェクションし、免疫沈降を(A)と同様に行った。MKP-3 CSはホスファターゼ活性を欠損した変異体である。(C) MAPKへの変異導入の複合体解離への効果。COS7細胞に図に示した各コンストラクトをトランスフェクションし、免疫沈降を(A)と同様に行った。(D) MAPKK-MAPK複合体解離の経時変化。 Δ B-Raf:ER細胞にMAPKとHA-MAPKKを共発現した。図に示した各時間だけ4-HT(1 μ M)で刺激し、免疫沈降を行った。(E) MAPKの二量体形成変異導入の複合体解離への影響。COS7細胞に図に示した各コンストラクトをトランスフェクションし、免疫沈降を(A)と同様に行った。(A)-(E)の各結果はそれぞれ2-6回行った実験の代表的な例である。

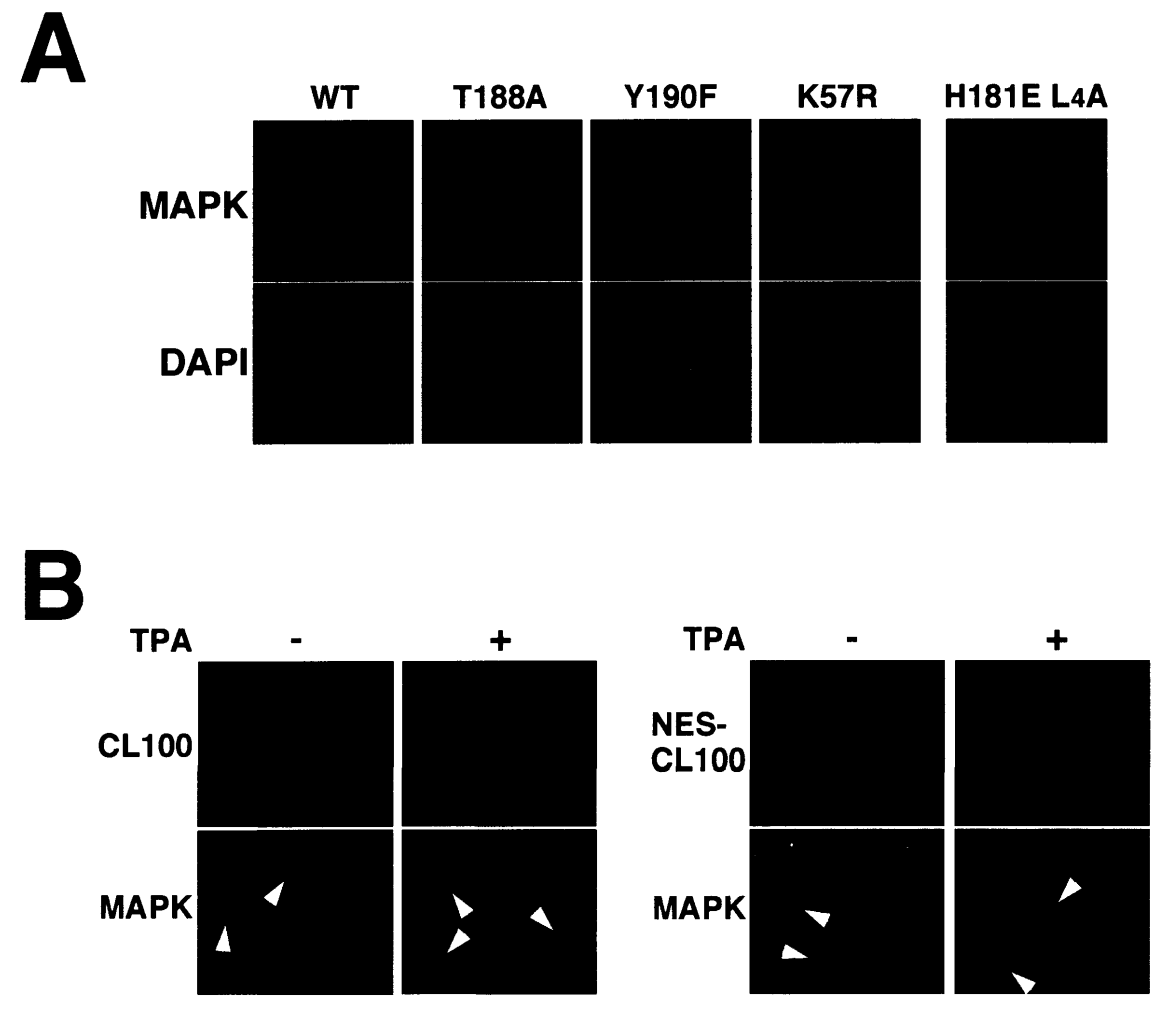


図3 MAPKの核移行にはMAPKKからの解離が必要である。(A) MAPKKから解離できないMAPK変異体は核移行できない。NIH3T3細胞に、野生型MAPK(WT), T188A MAPK(T188A), Y190F MAPK(Y190F), キナーゼ不能型MAPK(K57R), 二量体形成不能型MAPK(H181E L4A)をそれぞれ活性型MAPKK(SDSE MAPKK)と共発現した。トランスフェクションの8時間後、細胞を固定し抗MAPK抗体での細胞染色を行った。(B) MAPKのリン酸化を核ではなく細胞質で阻害すると、MAPKの核移行が阻害される。COS7細胞にmyc-NES-CL100またはmyc-CL100をトランスフェクションした。24時間血清除去し、そのまま(-)あるいはTPA(500 ng/ml)で5分間刺激した後(+), 細胞を固定した。細胞は抗myc抗体と抗ERK1抗体で染色した。図中の矢頭はトランスフェクションされた細胞を示す。(A)-(B)の各実験は3回行い、それぞれ同様の結果を得た。

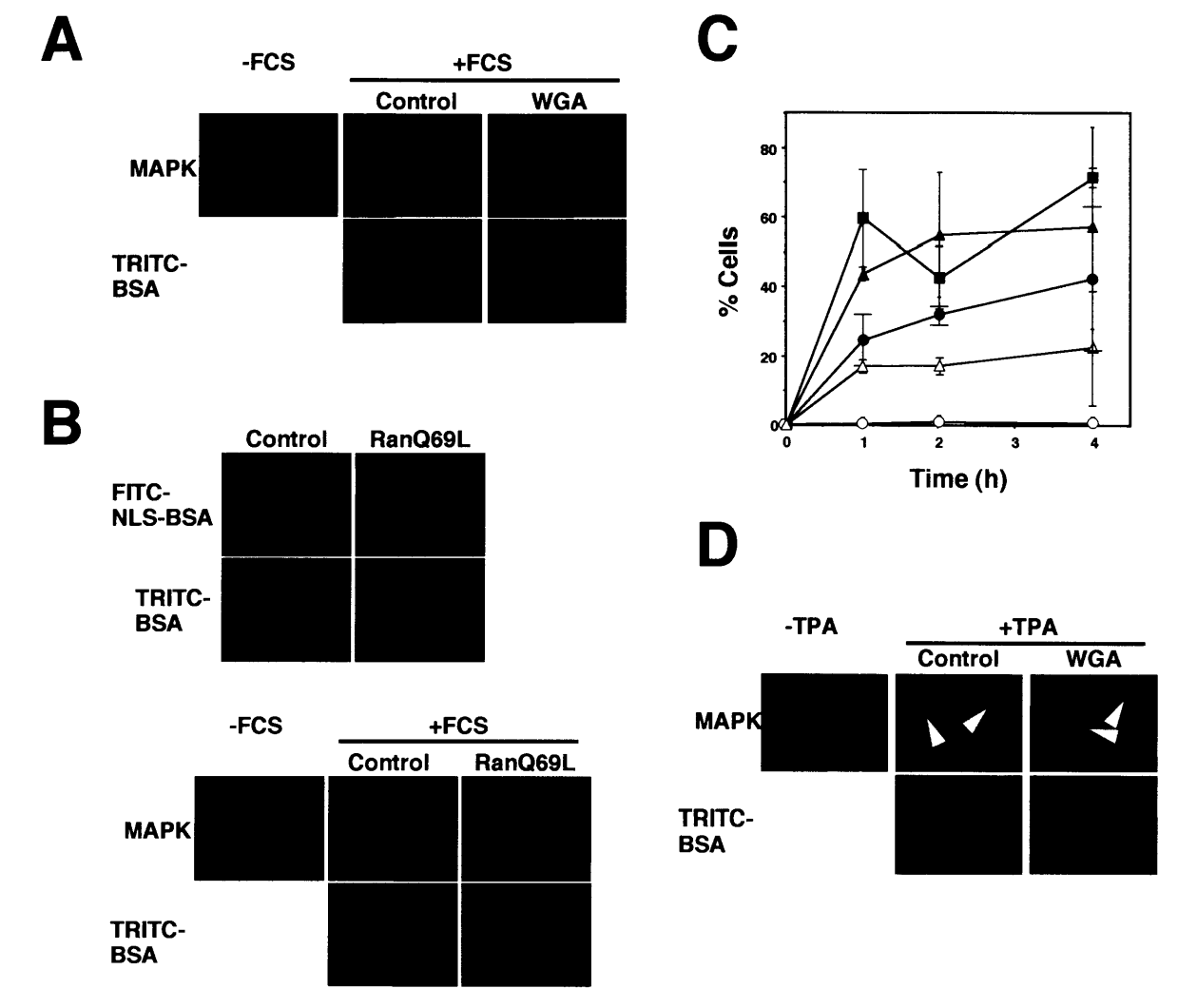


図4 内在性MAPKの核移行へのWGAおよびRanQ69Lの効果。(A) A6細胞を36時間血清除去し、細胞質にコントロールの緩衝液(Control)またはWGA(2 mg/ml)をマーカー(TRITC-BSA)と共に微量注入した。10% FCSで4時間刺激した後、細胞を固定して抗MAPK抗体で染色した。同様の条件下で、NLSを結合させたBSA(FITC-NLS-BSA)の核移行は完全に阻害された(data not shown)。(B) A6細胞を36時間血清除去し、細胞質に緩衝液(Control)またはRanQ69L(9.3 mg/ml)をTRITC-BSAと共に微量注入した。上図の実験ではFITC-NLS-BSAも同時に微量注入した。10% FCSで4時間刺激した後、細胞を固定して抗MAPK抗体で染色した(下図)またはそのまま観察した(上図)。(A)-(B)の各実験は少なくとも3回行い、それぞれ同様の結果を得た。(C) A6細胞を36時間血清除去し、細胞質にコントロールの緩衝液(●, ○), WGA(2 mg/ml; ▲, △)またはRanQ69L(9.3 mg/ml; ■)をTRITC-BSAと共に微量注入した。細胞を無処理のまま(白抜き記号)、あるいは10% FCSで刺激(黒い記号)して、0,1,2,4時間静置し、抗MAPK抗体で細胞染色した。MAPKの核の染色が細胞質での染色よりも強いと同じである細胞の割合を各時間において計測し、グラフ化した。2回行った実験の平均値を示す。各点において16-269の細胞を計測した。(D) 3Y1細胞を36時間血清除去し、細胞質に緩衝液(Control)またはWGA(2 mg/ml)をTRITC-BSAと共に微量注入した。TPA(100 ng/ml)で5分間刺激したのち、細胞を固定し、抗ERK1抗体での細胞染色を行った。実験は2回行い、それぞれ同様の結果を得た。

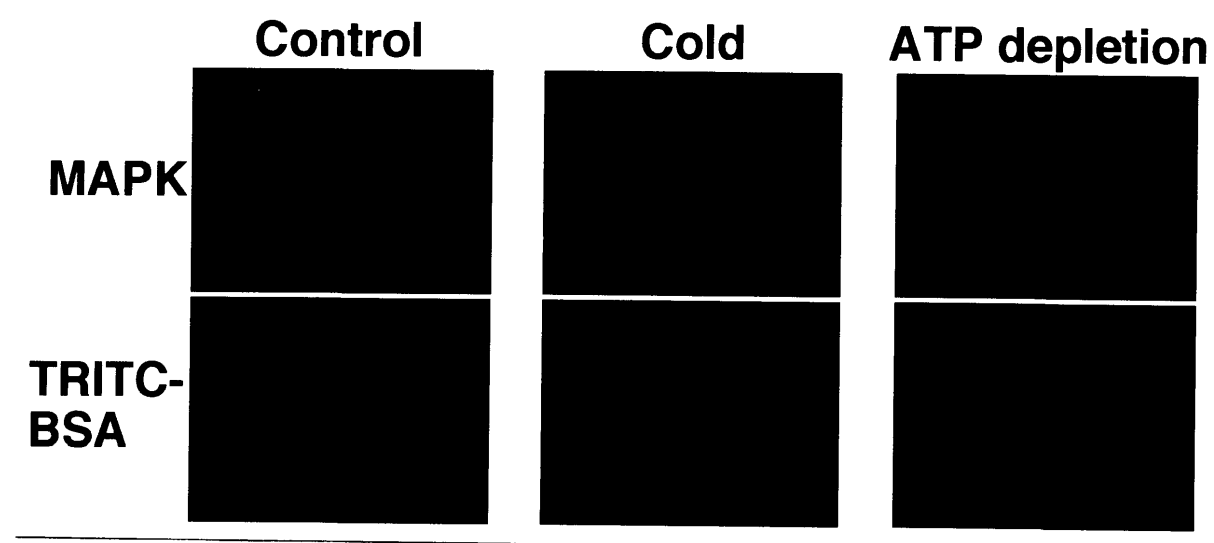


図5 MAPKは単純拡散で核移行できる。Hisタグ付きのMAPK(4.5 mg/ml)をTRITC-BSAと共に3Y1細胞の細胞質に微量注入し、次いでそのまま(Control)、氷上で(Cold)、あるいはATPを除去した培地で(ATP depletion)それぞれ1時間静置した。細胞を固定し、抗MAPK抗体で細胞染色した。実験は3回行い、それぞれ同様の結果を得た。

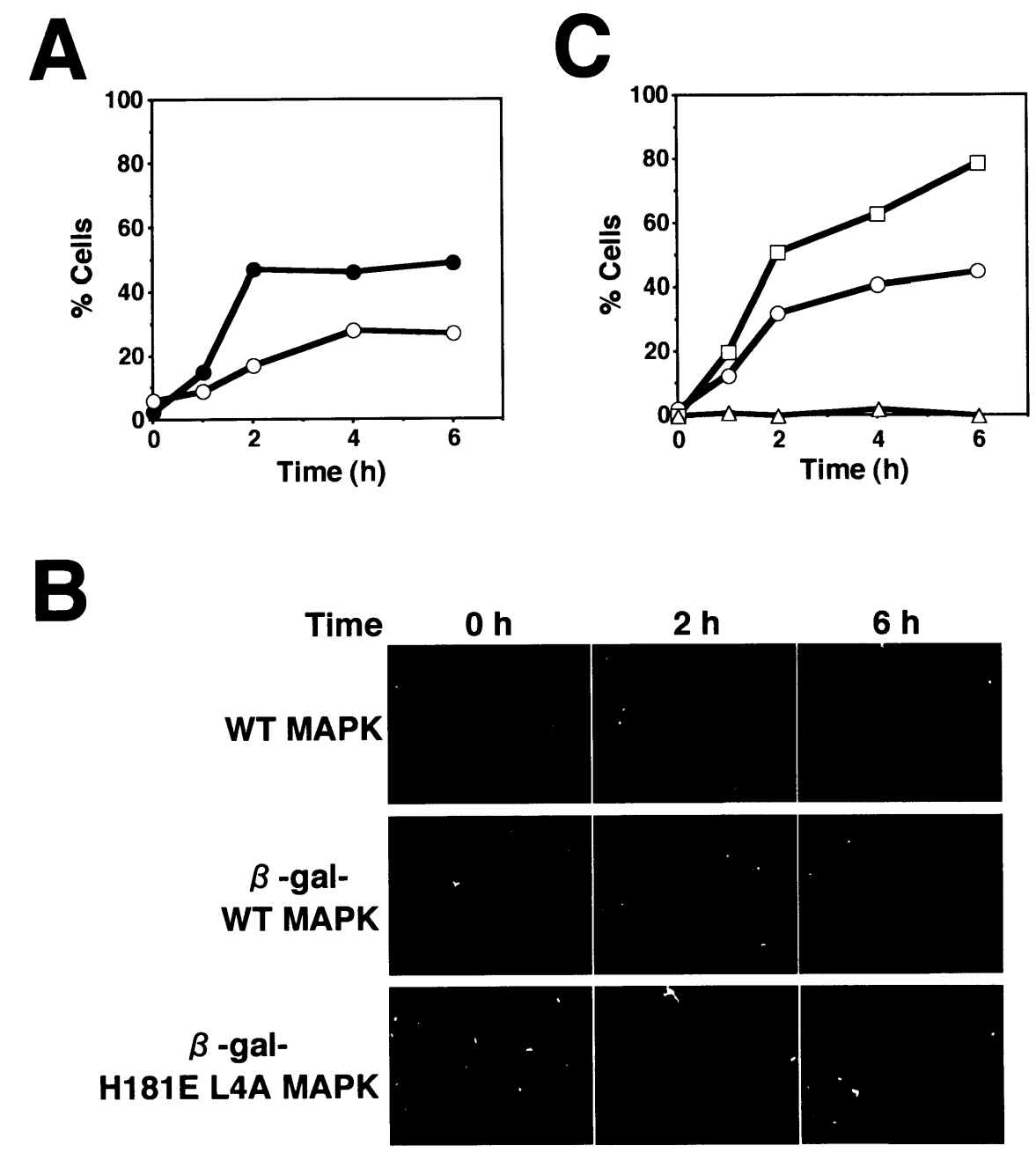


図6 二量体を形成したMAPKは能動的に核移行できる。(A) Δ B-Raf:ER細胞にHA-MAPKKと野生型MAPK(●)またはH181E L4A MAPK(○)を共発現した。4-HT(1 μ M)で0,1,2,4,6時間刺激し、抗HA抗体および抗MAPK抗体で細胞染色した。HA-MAPKKとMAPKとが共に発現していた細胞の中で、MAPKの核の染色が細胞質での染色よりも強いと同じである細胞の割合を各時間において計測し、グラフ化した。2回行った実験の代表例を示す。各点において100の細胞を計測した。(BおよびC) Δ B-Raf:ER細胞にHA-MAPKKと野生型MAPK、 β -gal-MAPKまたは β -gal-H181E L4A MAPKを共発現して4-HT(1 μ M)で0,1,2,4,6時間刺激し、抗HA抗体および抗MAPK抗体で細胞染色を行った。(B) 4-HT刺激後0,2,6時間後の代表的なMAPK染色像を示す。(C) HA-MAPKKと各MAPKとが共に発現していた細胞の中で、MAPKの核の染色が細胞質での染色よりも強いと同じである細胞の割合を各時間において計測し、グラフ化した。2回行った実験の代表例を示す。各点において100の細胞を計測した。野生型MAPK(○), β -gal-MAPK(□), β -gal-H181E L4A MAPK(△)。

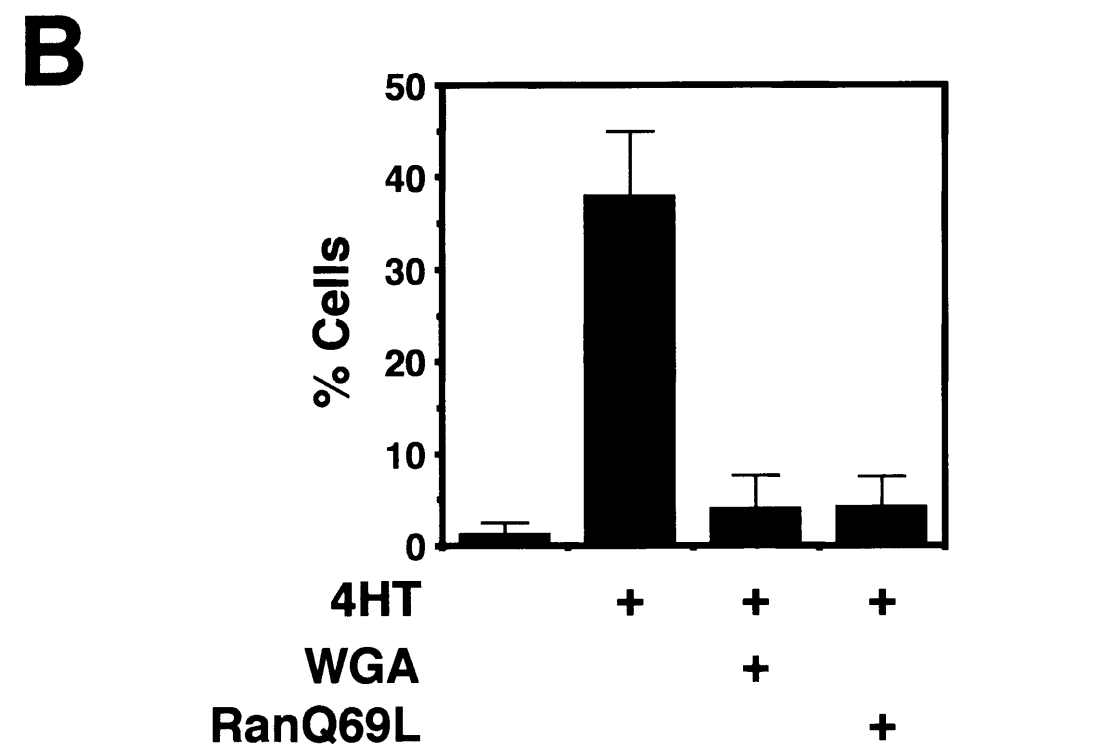
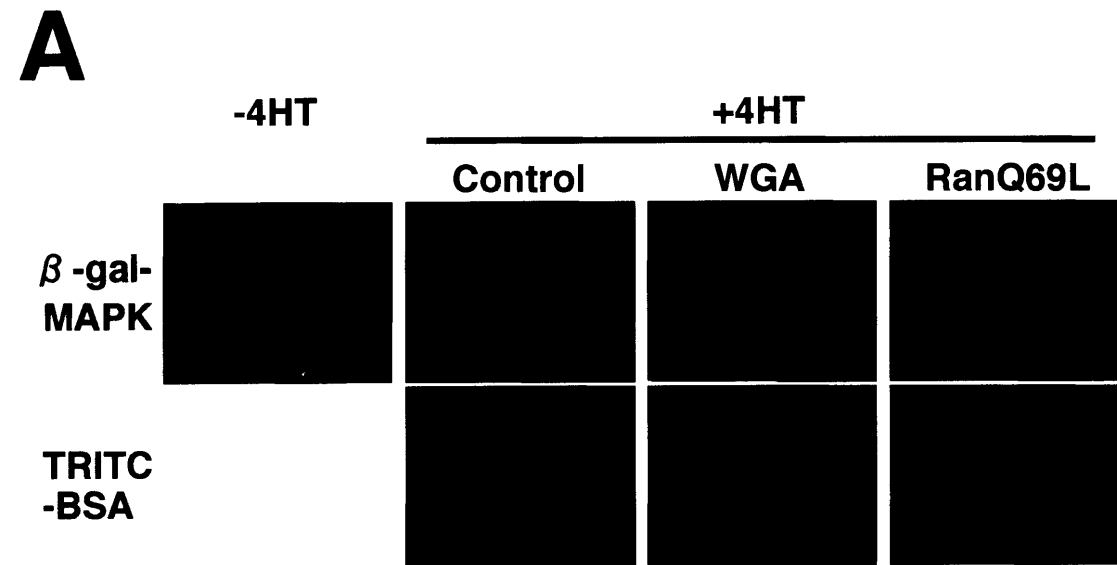


図7 β -gal-MAPKの核移行はWGAおよびRanQ69Lで阻害される。 Δ B-Raf:ER細胞の核にHA-MAPKKと β -gal-MAPKの発現ベクターを微量注入し(それぞれ100 μ g/ml)、4時間静置した。次いで同じ細胞の細胞質にWGA(2 mg/ml)またはRanQ69L(14.4 mg/ml)をTRITC-BSAと共に微量注入し、すぐに4-HT(1 μ M)で2時間刺激した。細胞を固定し、抗HA抗体および抗MAPK抗体で染色した。(A) β -gal-MAPKの代表的な染色像を示す。(B) 独立した3回の実験結果を統計しグラフ化したもの。HA-MAPKKと β -gal-MAPKとが共に発現していた細胞の中で、MAPKの核の染色が細胞質での染色よりも強いと同じである細胞の割合を各時間において計測した。各々の実験において13-179の細胞を計測した。

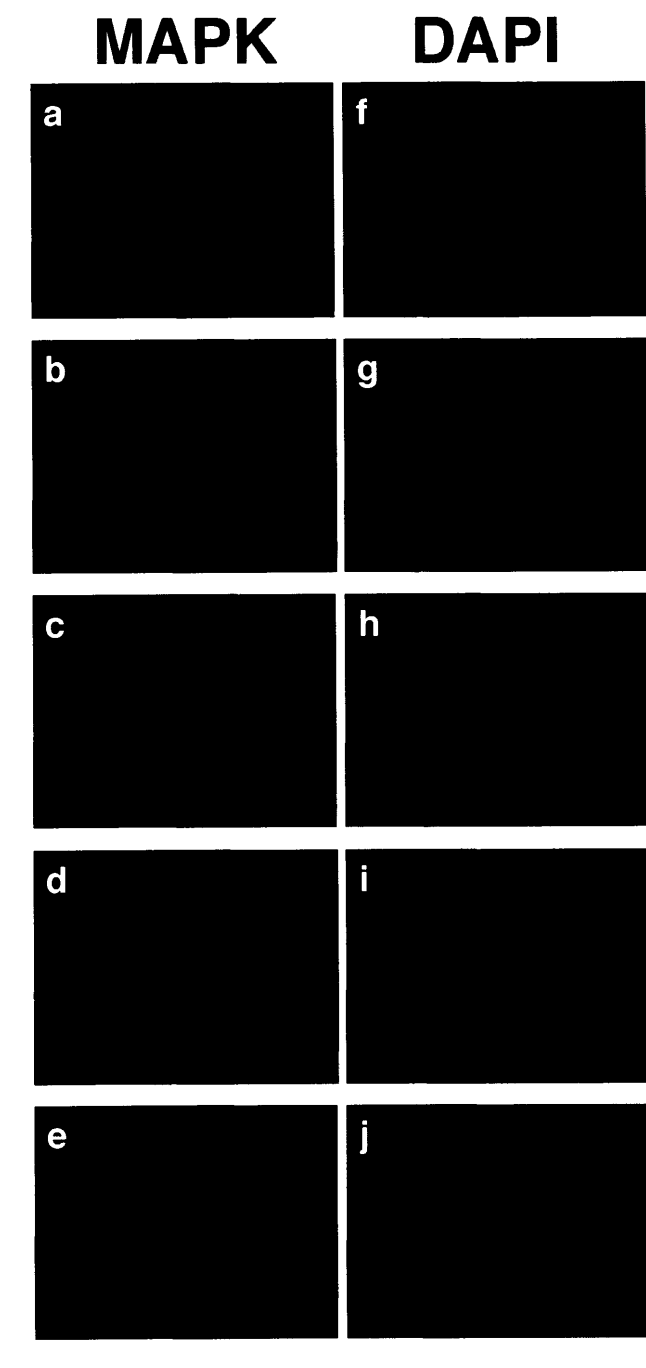


図8 MAPKの核から細胞質への再局在は核外移行によって行われる。抗MAPK抗体(a-e)またはDAPI(f-j)による染色像を示す。A6細胞を36時間血清除去した(a,f)のち、10% FCSで4時間刺激した(b,g)。そしてCHX(50 μ g/ml)で細胞を10分間処理し、次いで血清を除去しさらにCHX存在下で10分間静置した(d,i)か、あるいはコントロールの緩衝液で10分間処理し、次いで血清を除去しさらに緩衝液存在下で10分間静置した(c,h)。血清刺激無しにCHXまたは緩衝液で10分間処理してもMAPKの細胞内局在に変化は無かった(data not shown)。Lenormandらが報告したように、CHX(50 μ g/ml)存在下で10% FCSで4時間刺激してもMAPKは全く核へ局在しなかった(c,j)ので、この細胞でこの濃度でのCHXには効果があることが確認された(Lenormand et al., 1998)。実験は2回行い、それぞれ同様の結果を得た。

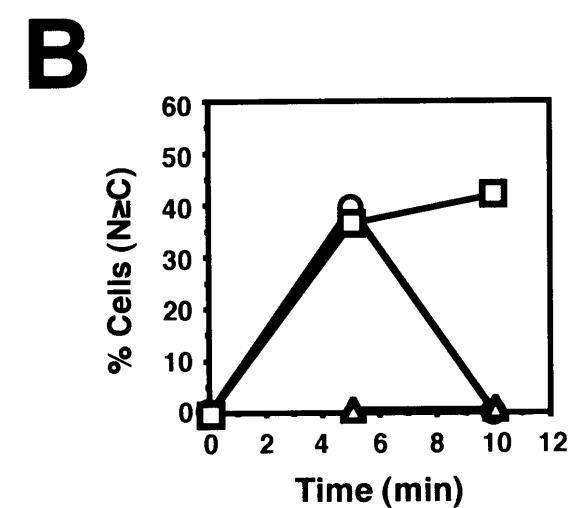
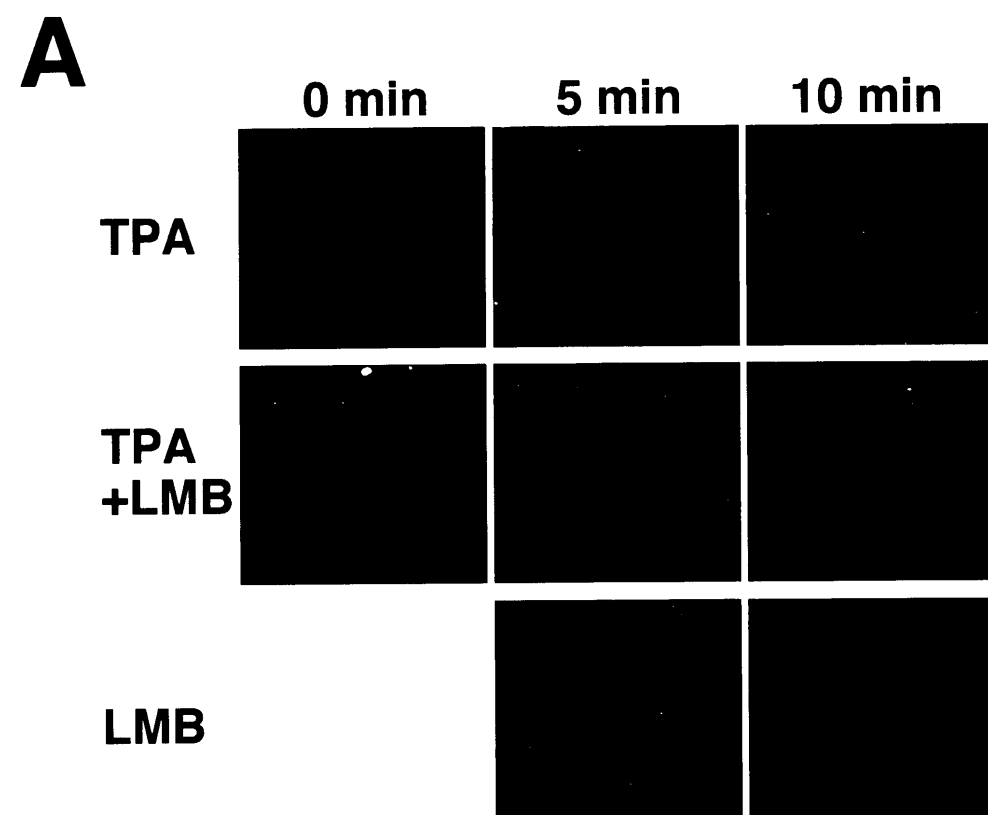


図9 LMBはMAPKの核外移行を阻害する。3Y1細胞を36時間血清除去したのち、TPA(500 ng/ml)のみで刺激した(上段の図(A), ○(B))か、LMB(0.4 ng/ml)をTPA処理後5分後に加えた(中段の図(A), □(B))か、またはLMBのみで処理した(下段の図(A), △(B))。細胞を固定後、抗ERK1抗体で細胞染色した。(A) 代表的なERK1染色像を示す。(B) 代表的な実験の結果を統計したもの。内在性MAPK(ERK1)の核の染色が細胞質での染色よりも強いと同じである細胞の割合を各時間において計測し、グラフ化した。86-116の細胞を計測した。実験は4回行い、それぞれ同様の結果を得た。

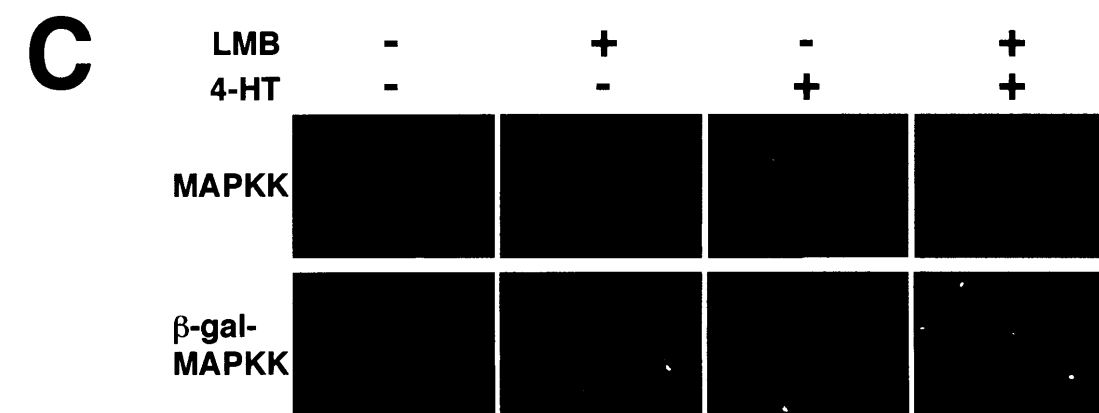
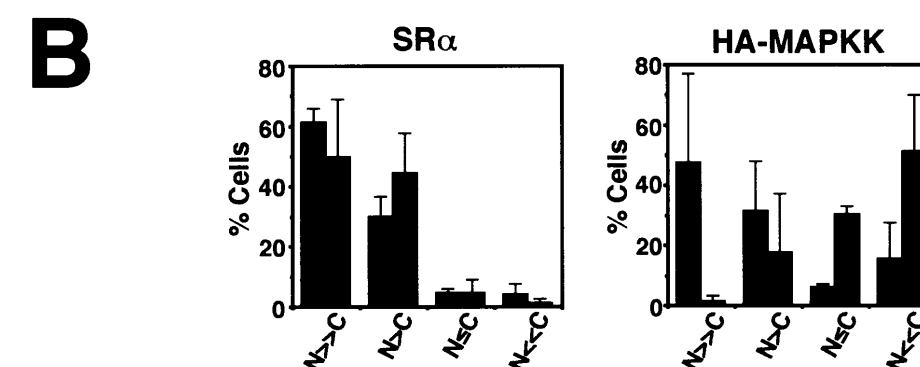
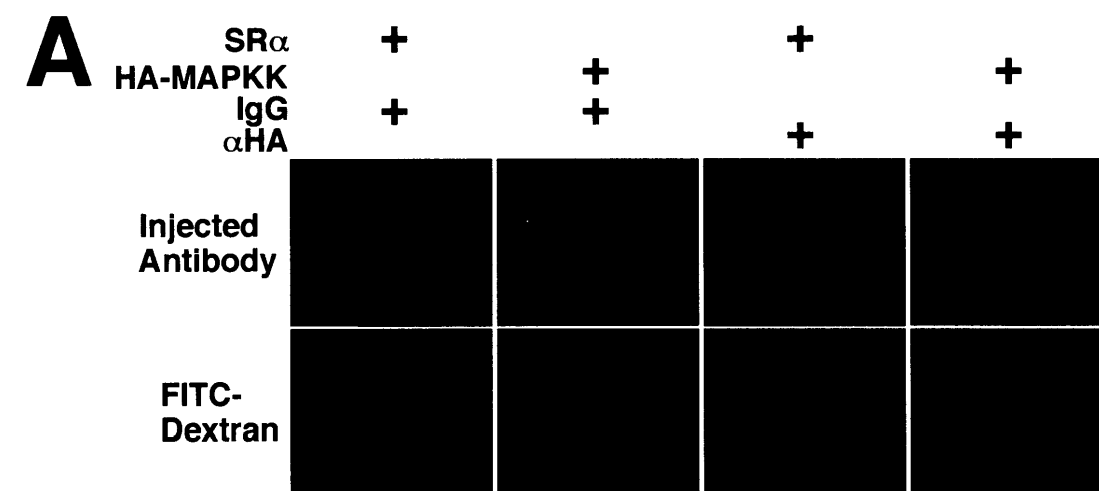


図10 MAPKは細胞質と核の間を往来する。(AおよびB) 3Y1細胞を48時間血清除去した。次いで、核に抗HA抗体(αHA, 20 mg/ml)またはコントロールの非免疫の抗体(IgG, 20.4 mg/ml)を、HA-MAPKKの発現ベクター(HA-MAPKK, 150 μg/ml)またはコントロールの空ベクター(SRα, 150 μg/ml)と共に微量注入した。また全ての微量注入においてFITC標識したデキストラン(FITC-Dextran, 800 μg/ml)を同時に微量注入している。微量注入後5または16時間後、細胞を固定してCy3標識した抗マウスIgG抗体で染色した。(A) 微量注入後16時間後の典型的な染色像を示す。(B) 抗HA抗体を微量注入した実験についてのみ、結果を定量したもの。抗HA抗体の染色像の細胞内局在の違いを4段階に分類した。N>>C, 染色像は核のみ、N>C, 核の染まりが細胞質のそれより強い、N<C, 細胞質の染まりが核の染まりと同じかそれより強い、N<<C, 染色像は細胞質のみ。1回の実験で各条件において56-295の細胞を計測した。灰色のグラフ、微量注入後5時間、黒色のグラフ、微量注入後16時間。(C) ΔB-Raf:ER細胞にHA-MAPKKまたはHA-β-gal-MAPKKをMAPKと共に発現させた。次いで細胞をLMB(20 ng/ml)および4-HT(1 μM)で5時間刺激し、固定後抗HA抗体で染色した。実験は2回行い、それぞれ同様の結果を得た。

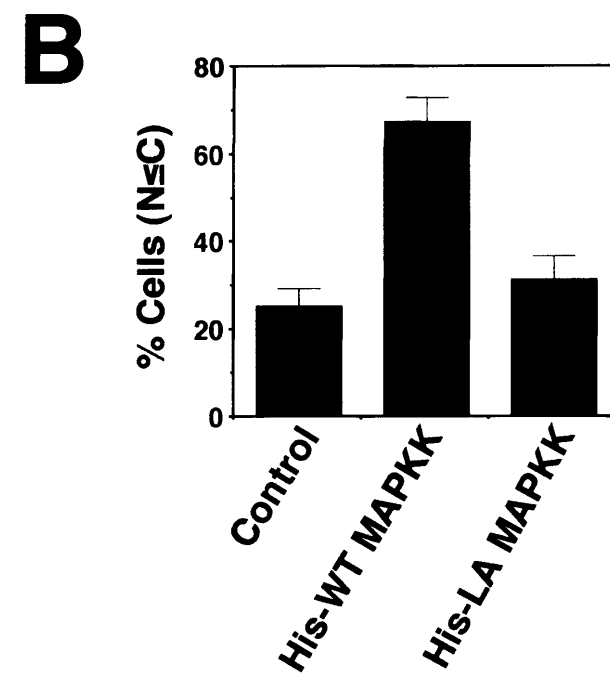
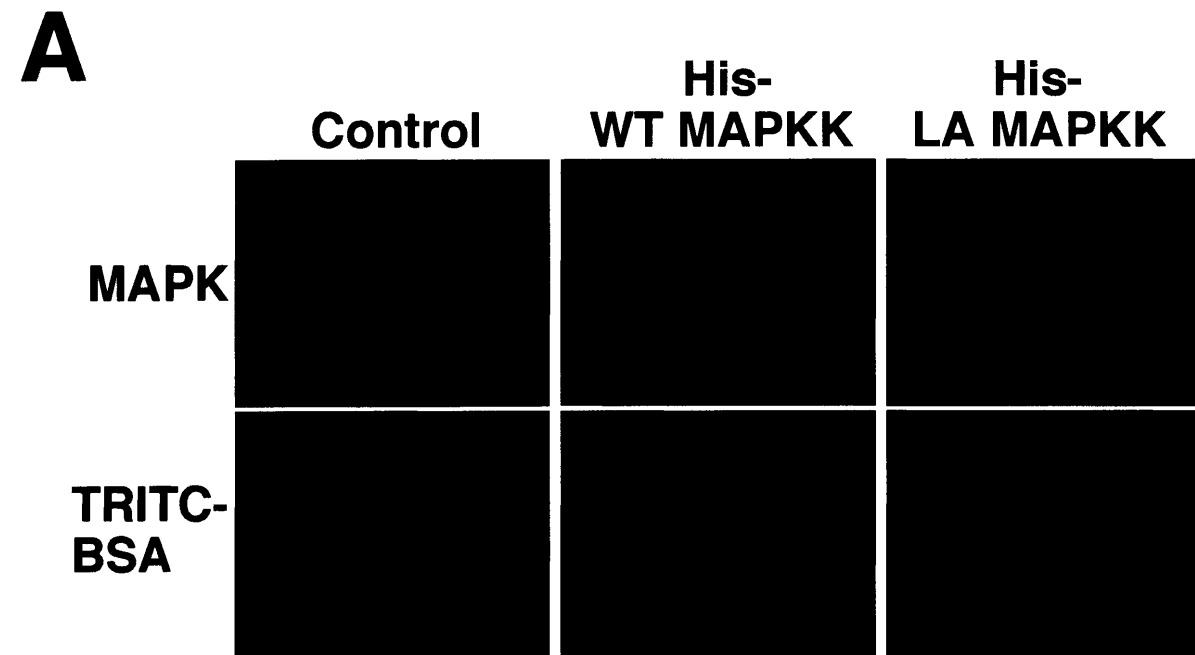


図11 MAPKの核外移行は野生型MAPKKを微量注入することで促進されるが、NES変異型のMAPKKでは促進されない。3Y1細胞の核にTRITC-BSAとHisタグ付きのMAPK(5.0 mg/ml)を単独で(Control)、またはHisタグ付きの野生型MAPKK(5.0 mg/ml)と一緒に(His-WT MAPKK)、あるいはHisタグ付きのNES変異型MAPKK(5.0 mg/ml)と一緒に(His-LA MAPKK)それぞれ微量注入した。5分後細胞を固定し、抗MAPK抗体で染色した。(A)典型的な染色像を示す。(B)独立した3回の実験結果を統計しグラフ化したもの。細胞質での染色が核での染色よりも強い細胞の割合を計測した。1回の実験で各条件につき76-272の細胞を計測した。

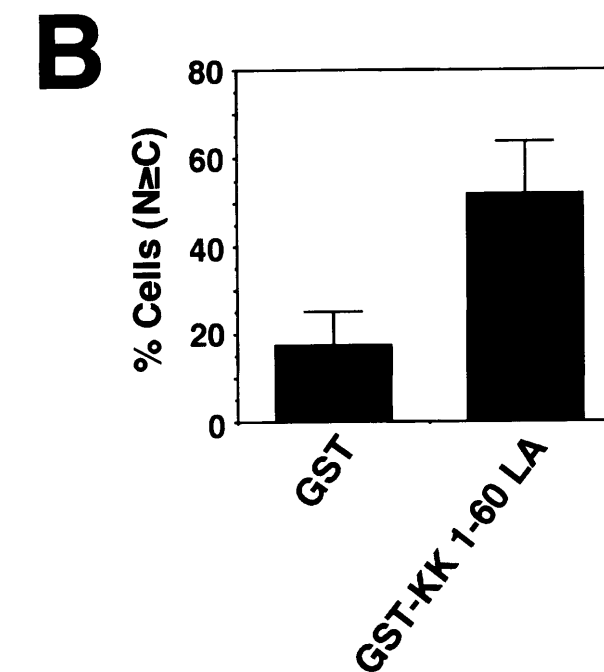
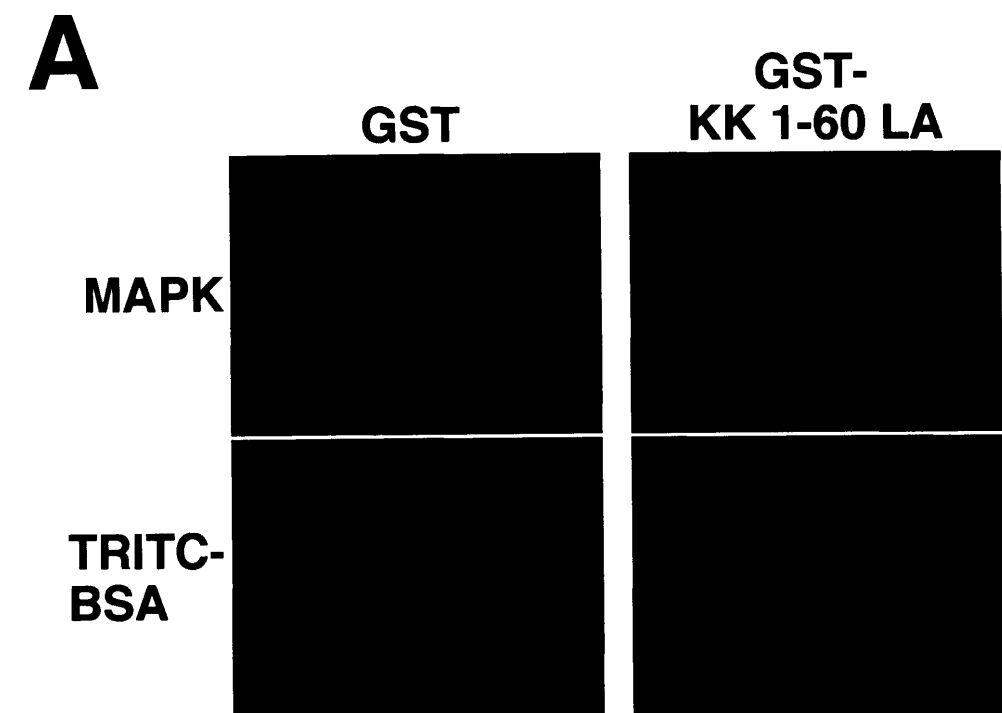


図12 MAPKの核外移行は核内でのMAPKとMAPKKとの結合を妨げることで阻害される。A6細胞を36時間血清除去したのち、10% FCSで4時間刺激した。次いで核にGST(15.0 mg/ml)またはNES配列に変異を導入したMAPKKの1-60番目までのアミノ酸残基のGST融合タンパク質(GST-KK 1-60 LA, 16.0 mg/ml)を、TRITC-BSAと共に微量注入した。すぐに培地の血清を除去し、10分間静置後、細胞を固定し抗MAPK抗体で染色を行った。(A)典型的な染色像を示す。(B)独立した3回の実験結果を統計しグラフ化したもの。核での染色が細胞質での染色よりも強い細胞の割合を計測した。1回の実験で各条件につき133-262の細胞を計測した。

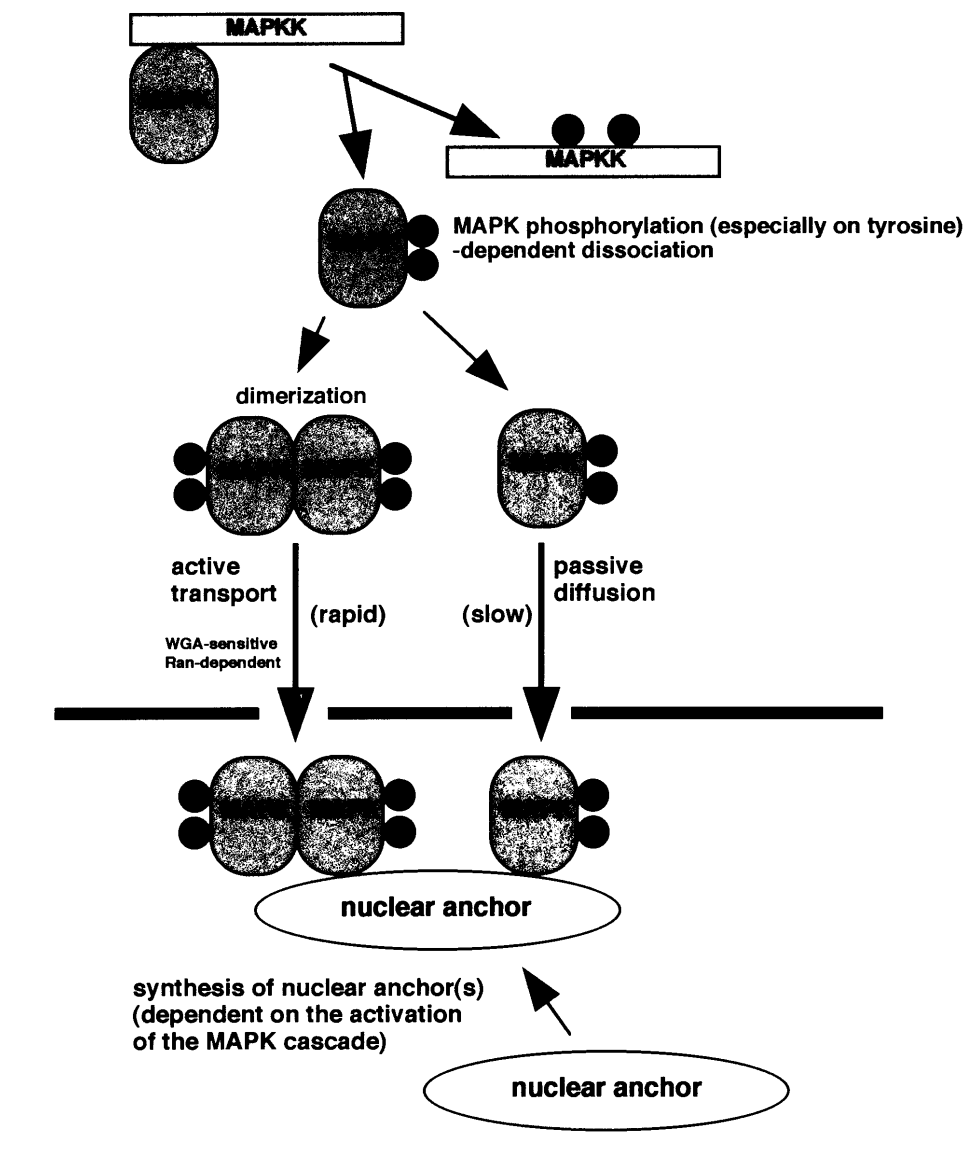


図13 考えられるMAPKの核移行の制御機構のモデル図。詳しくは本文を参照。

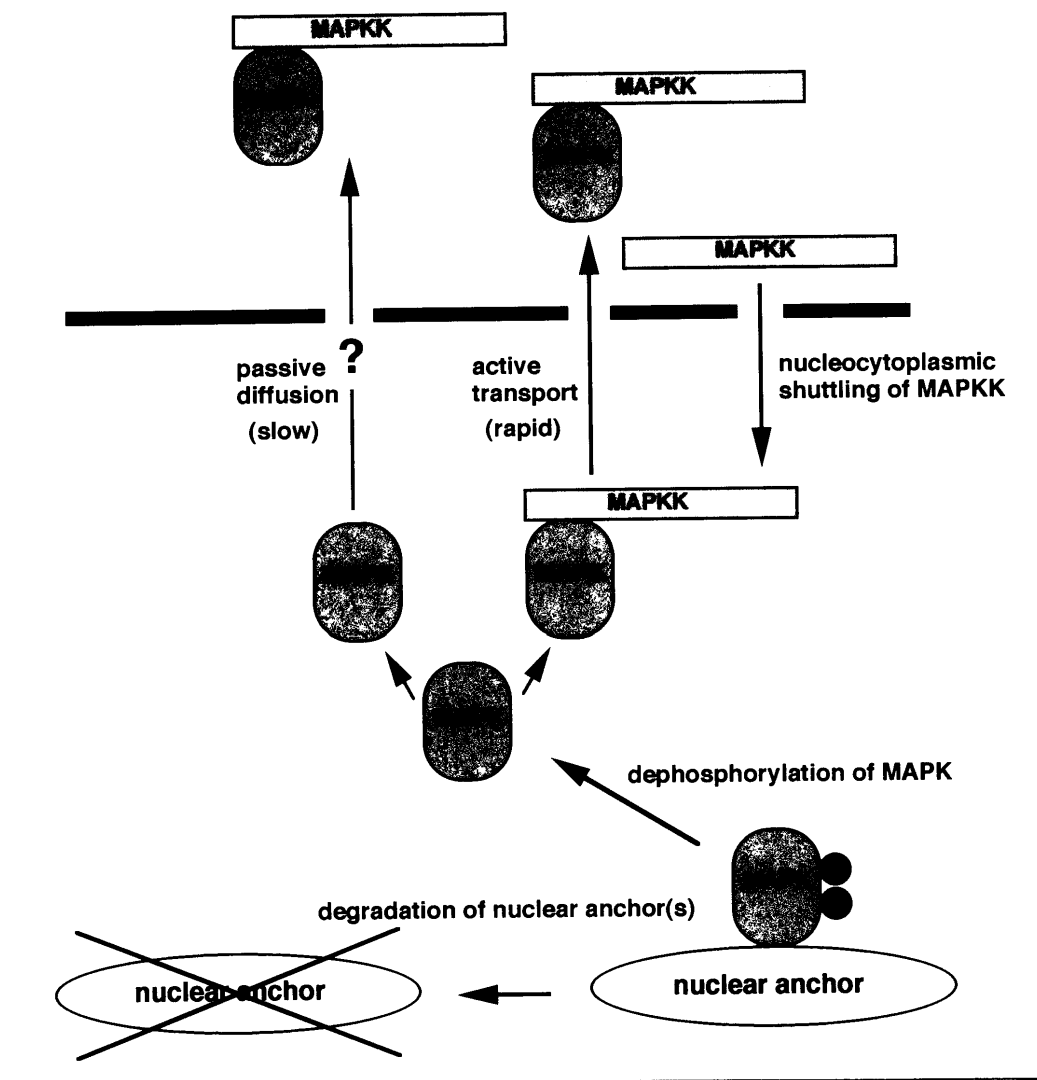


図14 考えられるMAPKの核外移行の制御機構のモデル図。詳しくは本文を参照。

考察

1. MAPKKはMAPKの細胞質アンカーである

本研究において我々は、MAPKの示す刺激依存的な細胞質-核間移行についてその制御機構の解析を行った。まず、MAPKKがMAPKの細胞質アンカーとして働くという我々の仮説を、LMB処理によってMAPKKの細胞質局在を阻害したときに、同時に内在性MAPKの核移行が誘起されたことから裏づけた(図1)。そして事実、MAPKKからの解離はMAPKの核移行に必要であった(図3)。ここで注意すべきは、LMB処理によってMAPKの核移行が誘起されるときにMAPKK-MAPK複合体の解離は生じていないということである(data not shown)。すなわち、MAPKKとMAPKの結合は可逆的であり、LMB処理をしたときにはこの両者がそれぞれ単独で、単純拡散によって核内へ移行し、そこで再び結合を生じると思われる。つまりこのとき能動輸送は行われていないと考えられる。

2. MAPKのチロシン残基のリン酸化によってMAPKK-MAPK複合体の解離が生じる

我々はMAPKのチロシン残基のリン酸化がMAPKのMAPKKからの解離に必要であることを示した(図2)。事実、この一連の実験において我々は、リン酸化された野生型MAPKのMAPKKとの結合を一度も観察しなかった。図2Cにおいて、リン酸化されたT188A MAPKやK57R MAPKのMAPKKとの結合が見られるのは、MAPKに変異を導入したために見られる非特異的な結合によるものであると考えている。一方、弱いMAPKの活性が複合体の解離に寄与している可能性を完全には否定できないが、以下の事実によってその可能性は非常に低いと考えられる。すなわち、1)MAPKKは、そのMAPK結合部位内にin vitroでMAPKによってリン酸化され得るスレオニン残基(Thr23)を持っているが(data not shown)、我々の実験ではこの部位に変異を導入しても複合体の形成あるいは解離に何の影響も示さなかった(data not shown)。2)MAPKKとMAPK(ただしMAPKの二つのサブタイプのうちのERK1のみ。本研究で用いているMAPKはERK2に相当する)との結合を特異的に促進するとされるMP1にはMAPKによってリン酸化され得る部位が無い(Schaeffer et

al., 1998)。3)MAPKはリン酸化を受けるのとほぼ同時にMAPKKから解離するので(図2D)、下流の因子のリン酸化反応を含む事象が関与する時間がほとんど無いと思われる。したがって、MAPKKによってリン酸化を受けたMAPKの引き起こす自身の三次元的構造変化(Canagarajah et al., 1997)が、結合の解離の引き金になると考えられる。

3. MAPKのリン酸化状態とMAPKの核移行との関係について

Lenormandらは、リン酸化部位に変異を導入し、リン酸化を受けられなくなったMAPKでも細胞へ過剰発現した場合に刺激依存的に核へ移行できたことから、MAPKのリン酸化はMAPKの核移行およびその核への濃縮に必要でないとしていた(Lenormand et al., 1993)。しかしながら、彼らはMAPKを単独で過剰発現していたため、MAPKの核移行の最初のステップであるMAPKKからの解離を必要としない系で実験を行っていたことになる。また彼らは最近、細胞への増殖刺激によって核内でMAPKを留める核アンカーが合成され、それがMAPKを核内に濃縮させるのではないかという報告を出しており(Lenormand et al., 1998)、彼らの見出した過剰発現した変異型MAPKの核への濃縮はこの核アンカーによって説明が可能である。したがって、MAPKのリン酸化はその核移行に必要であり、リン酸化されたMAPKのみが核へ移行できるとも考えられる。しかし一方、Khokhlatchevらはリン酸化を受けたMAPKは非リン酸化型のMAPKとも二量体を形成し、その核移行を促進し得ると報告している(ただし彼らの報告もまたMAPK単独の過剰発現の実験を基にしている)(Khokhlatchev et al., 1998)。したがって、もしリン酸化されたMAPKがリン酸化を受けていないMAPKをMAPKKから引き離し、非リン酸化型MAPKと二量体を形成することができるなら、非リン酸化型のMAPKでも核移行ができるかもしれない。この点についてはさらに検証が必要である。

ところで、多くの場合MAPKのリン酸化は細胞への刺激後5-10分でピークとなる。にもかかわらず、細胞によってはMAPKの核移行が最も強く見られるのは刺激後4-6時間経った後である。したがって、MAPKはリン酸化を受けたからといって必ずしもすぐに核へ濃縮できるわけではないということになる。しかし、MAPKはリン酸化を受けるとすぐ

にMAPKKから解離するので(図2D)、MAPKKからの解離の段階は律速ではない。一方上で述べたように、MAPKの核アンカーがMAPKカスケードの活性化に依存して作られることが示唆されている。したがって、MAPKはリン酸化を受けるとすぐにMAPKKから解離し、核へ一過的に移行できるが、十分な量の核アンカーが合成されない間はそこに留まることができず、すぐに核外移行機構によって細胞質へ排出されるのだと考えられる。

4. 単純拡散と能動輸送

我々の実験により、MAPKは単純拡散によってのみならず(図4 および 図5)、WGA感受性でRan依存的な能動輸送機構を介しても核移行ができることが明らかになった(図6 および 図7)。では何故このような独立した二つの機構が必要となるのだろうか。図4Cに示したように、単純拡散による核移行は、A6細胞などにおいて血清刺激によって誘導される、4-6時間掛けた比較的ゆっくりとした核移行を説明するには十分なのかもしれない。しかし、図4Dで示したような、3Y1細胞などにおいてTPAによって誘導される、5分程度で生じる素早い核移行は部分的にはあるが顕著にWGAによって抑制され、能動輸送機構の関与が示唆された。したがって、能動輸送機構は、MAPKの核移行が素早く生じる場合があるならば、その時には必要になるのかもしれない。しかし、どのような場合に素早い核移行が生じるのかは明らかではない。

また、MAPKの二量体形成によって生じるRan依存的な能動輸送が、どのように行われるかについても明らかではない。ただ、RanがNLS配列をもったタンパク質の能動的核移行に必要とされていることを考えると、二つの可能性が考えられる。一つは、二量体を形成することによってNLSとして働く配列が形成される可能性。もう一つは、二量体形成によって初めてMAPKと結合する分子が存在し、その分子がNLS配列を持つというものである。前者について言えば、一次配列上には存在しないNLS配列が、二量体を形成することで初めて(三次元構造上に)現れることを意味し、これまでにそのような分子は知られていない。また後者についても、MAPKが二量体を形成することで初めて

MAPKに結合できる分子はこれまでに知られていない。したがってどちらの可能性についても非常に興味深く、この点についてもこれからの重要な研究課題だろう。

ところで、図6Bおよび図6Cにおいて、 β -gal-MAPKの核移行が野生型MAPKの核移行よりも速度が速く、またその核への濃縮の程度も大きかった。このことは、 β -ガラクトシダーゼがそれ自身で四量体を形成できるという報告があることを考えると、 β -ガラクトシダーゼの四量体形成のために細胞内での β -gal-MAPK同士の会合が野生型MAPKよりも生じやすくなり、その結果能動輸送の寄与が β -gal-MAPKの場合は大きくなるからだと考えられる。そしてこのことを応用すると、細胞内におけるMAPKの濃度が上昇するとMAPK同士の会合が生じやすくなり、それだけ能動輸送の寄与が大きくなると考えられる。そして実際興味深いことに、過剰発現したMAPKは、内在性MAPKの核移行とは異なり、その核移行がWGAやRanQ69Lによって有意に抑制されることが見い出された(data not shown および 図4C)。これまで知られている限り、細胞内のMAPK濃度が顕著に増減するような事例は知られていないが、もしそのような例が存在するならば、MAPKの核移行を制御する一つの機構と成り得るかもしれない。

5. MAPKKを介したMAPKの核外移行

我々は、1)MAPKの核から細胞質への局在変化は核外移行によって行われること(図8)、2)LMBによってMAPKの核外移行が阻害されること(図9)、3)MAPKKは細胞質と核の間を往来していること(図10)、4)野生型のMAPKKを核へ微量注入すると同時に微量注入したMAPKの核外移行を強く促進すること(図11)、5)MAPKの核外移行が核内でのMAPKKとMAPKとの結合を妨げることで阻害されること(図12)、を示し、これらの結果からMAPKの核外移行がMAPKKを介して行われている可能性を強く示唆した。しかしながら、核移行の場合と比較すると、核外移行の過程においてもその一部に単純拡散が関与している可能性がある。また、MAPKK以外の分子で、MAPK上の同じ部位をMAPKKと共にMAPK結合部位として共有し、かつNESを持つ分子が存在し、そのような分子がMAPKの核外移行を担っている可能性も排除できない。しかしながら、MAPKKはMAPK

の唯一の活性化因子として、MAPKの機能する細胞においては必ず発現していると推測されることから、MAPKKが最もその機能を果たしていると考えられる。したがって、MAPKKは1)MAPKの活性化因子としての機能、2)MAPKの細胞質アンカーとしての機能、3)MAPKを核外へ連れ出す運び屋としての機能、という三つの異なった側面を持つと考えられる。

そして重要なことは、もしMAPKKがMAPKの細胞質への運び屋として機能するならば、脱リン酸化されたMAPKのみが選択的に核から排出されることが考えられることである。何故なら、MAPKKはリン酸化されていないMAPKとのみ結合できるからである(図2)。この仮説を裏付けるように、我々の抗リン酸化型MAPK抗体および抗MAPK抗体を用いた細胞染色の実験から、3Y1細胞において、TPA刺激により活性化し核へ移行したリン酸化型MAPKは、不活性化されること無しに細胞質へ再局在することはなく、全て核内で脱リン酸化されてから核外移行していることが見い出された(data not shown)。またさらに、リン酸化されていないMAPKを培養細胞の核へ微量注入すると、比較的すぐに核外へ排出されるのに対し、チオリン酸化したMAPKの場合は長時間にわたって核内に留まり続けたという報告もある(Khokhlatchev et al. 1998)。これらの結果はいずれも我々のモデルと合致する。我々のモデルはまた、MAPKKを介したMAPKの核外輸送機構は、MAPKによる核へのシグナルを遮断する機能は持たないことを示唆する。何故なら、すでに不活性化されたMAPKの局在しか制御できないからである。したがって、MAPKの核外輸送機構は、次の活性化に備えて細胞質に蓄えておくMAPKを素早く補充し、MAPKのシグナル伝達が絶え間無く続くようにするために必要な機構であると考えられる。なおLenormandらは、存在が予想される核アンカーの分解をプロテアソーム阻害剤によって阻害すると、たとえ不活性化されてもMAPKは核に留まり続けることを見い出している(Lenormand et al., 1998)。このことは、MAPKと核アンカーとの結合はMAPKのリン酸化状態によらず生じ得ることを示唆している(またこのことは、MAPKが核へ留まるためには核内でのリン酸化を必ずしも必要としないという我々の結果(図3B)とも合致する)。したがって、MAPKの核外移行にはそれに先立つ核アンカーの分解が必要な

のかもしれない。

6. 結論

本研究によって得られた結果、およびこれまでに得られていた知見を基にして、MAPKの細胞質-核間移行の制御機構のモデルを描くと図に示したようになる(図13および図14)。興味深いことに、このモデルは分裂酵母のMAPKの一種であるSpc1、および出芽酵母のMAPKの一種Hog1の細胞内局在制御のモデルと、それぞれ一致はしないが、非常に似た面を持っている。Spc1は通常細胞質にのみ局在するが、高浸透圧刺激によって活性化すると核移行する。そしてこのとき、MAPKKであるWis1との解離を伴い、またその解離にはSpc1の活性ではなくリン酸化が必要とされる(ただしWis1はSpc1の細胞質アンカーとしては働いていないようである)。また、核移行の過程そのものは不明だが、Spc1の核への濃縮には、核アンカーとして基質である転写因子のAtf1が必要であることが明らかにされている(Gaits et al., 1998)。またHog1は高浸透圧刺激によって活性化し核移行するが、その過程にNLS受容体のホモログのNMD5、およびRanのホモログRan-GSP1を必要とすること、そしてその後の核外移行にはNES受容体のXPO1/CRM1が必要とされることが明らかになった(Ferrigno et al., 1998)。したがって、MAPKはその分子自体のみならず、その細胞内局在の制御機構も少なくともいくつかの側面において進化上保存されているようである。また現在までに、高等真核生物にはSAPK/JNK,p38,ERK5/BMK1などのMAPKスーパーファミリー分子が存在することが知られているが、今後これらの分子についてもその局在制御機構を明らかにしてゆくことが重要な課題となるだろう。また最近、MAPKの核移行に関連していくつか興味深い報告がなされている。そのひとつに、老化が進んだ細胞においては、増殖刺激によるMAPKの活性化は通常の細胞と大差無く生じるが、MAPKの核移行は顕著に抑制されるという報告がある。そして老化細胞でもNLS依存的な核移行は正常に行われているらしいこと、およびMAPKの核移行の抑制がSV40 large T antigenの細胞核への導入によって解除されることも見い出された(Kim-Kaneyama et al., 2000)。このことから、老化細胞ではMAPKの

活性化および核への（一過的な）移行は正常に行えるが、核アンカーの合成が正しく行われておらず、そのために核へ局在できないと推測できる。そしてSV40 large T antigenによってその抑制が解除されることから、SV40 large T antigenの下流で起こる事象が核アンカーの合成に関与しているのではないかという仮説が立てられる。この仮説の正当性についても今後の研究によって明らかにされるべきだろう。

材料と方法

細胞培養と微量注入

COS7細胞および3Y1細胞はダルベッコ変法イーグル培地(DMEM)にそれぞれ10%ウシ胎児血清(FCS)、抗生物質(100 U/mlペニシリン、0.2 mg/mlカナマイシン)を加えた培地中で5% CO₂インキュベーターにて37℃で培養した。ΔB-Raf:ER細胞はフェノールレッドを含まないDMEM培地に10%FCS、抗生物質を加えた培地中で5% CO₂インキュベーターにて37℃で培養した。A6細胞はLeibovitz's L-15培地に10%FCS、抗生物質を加えた培地中で22℃で培養した。微量注入はIM-188微量注入装置(Narishige)を用いて行い、試料はRanQ69Lの場合を除き全て微量注入用緩衝液(20 mM Hepes-KOH, pH7.4, 120 mM KCl)中に溶解した。低温下における微量注入実験では、3Y1細胞をあらかじめ氷上で30分静置し、微量注入時には装置の培養皿の設置台を冷やしておいた。ATP非存在下での微量注入実験では、3Y1細胞をグルコースを含まず6 mMデオキシグルコースおよび10 mMアジ化ナトリウムを加えたDMEM中で、実験の30分前から終了後1時間までの間飼っていた。

細胞染色

カバーガラス上で培養した細胞は、培地に最終濃度3.7%のホルムアルデヒドを加え、10分以上静置することで固定した。0.5%のTriton X-100を含むPBSに5分間浸けたのち、3% BSAを含むPBSで希釈した一次抗体をカバーガラスに乗せ、4℃で一夜静置した。その後蛍光標識した適当な二次抗体を同様に希釈し、カバーガラスに乗せ、室温で1時間静置した。用いた一次抗体およびその希釈率は以下の通りである。ウサギ抗アフリカツメガエルMAPK抗体(Fukuda et al., 1997a, 200倍希釈)、ウサギ抗ERK1抗体(K-23 Santa Cruz, 100倍希釈)、マウスモノクローナル抗HA抗体(12CA5, 200倍希釈)、マウスモノクローナル抗myc抗体(9E10 Santa Cruz, 100倍希釈)。細胞はMowiolにマウントし、観察は蛍光顕微鏡下(Zeiss Axiophoto)で行った。

トランスフェクションおよび免疫沈降

免疫沈降は基本的にはFukudaらの方法に従った(Fukuda et al., 1997a)が、いくつか改良した点がある。COS7細胞またはΔB-Raf:ER細胞をトランスフェクションの16時間前にそれぞれ60mmの培養皿に6x10⁵あるいは3.6x10⁵撻いた。用いたDNA量は1枚あたりそれぞれ6 μgおよび3.6 μgで、それらをCOS7細胞用にはLipofectAMINE (LifeTechnologies, Inc)、ΔB-Raf:ER細胞用にはLipofectAMINEおよびLipofectAMINE PLUS (LifeTechnologies, Inc)と、それぞれ無血清培地Opti-MEM(LifeTechnologies, Inc)中で混合し、それらをあらかじめOpti-MEMに置換しておいた各細胞培地中に添加して、トランスフェクションした。5時間(COS7細胞)あるいは2時間(ΔB-Raf:ER細胞)後、培地を元の10% FCS入りのDMEMに置換し、そのまま24時間培養した後さらに12時間血清を除いたDMEM培地で培養(COS7細胞)、あるいはそのまま36時間培養(ΔB-Raf:ER細胞)した。細胞を氷冷した抽出用緩衝液(E液; 20 mM Hepes-NaOH, pH7.4, 2 mM MgCl₂, 2 mM EGTA)で2回洗浄したのち、1% Aprotinin, 1 mM PhCH₂SO₂F, 2 mM dithiothreitol (DTT), 1 mM Na₃VO₄, 1 mM NaFを含んだE液(E*液)の300 μlで細胞を掻き採った。細胞を懸濁機で破碎したのち、15000 rpmで30分遠心して上澄み液を回収した。そのうち240 μlを7.5 μlの抗HA抗体(12CA5, 5 mg/ml)および50 μlの平衡化したprotein A sepharose (Pharmacia, Uppsala, Sweden)ビーズと混合し、4℃で1.5時間混ぜ続けた。ビーズを300 μlのE*液で3回洗浄し、次いで300 μlの溶出液(100 mM Gly-HCl, pH2.2)と1分間混した。軽く遠心したのち、上澄みの150 μlをすぐに12 μlの中和液(1.5 M Tris-HCl, pH8.8)と混合した。この試料を抗HA抗体および抗MAPK抗体でのイムノブロッティングで解析した。

細胞染色のためのNIH3T3細胞およびΔB-Raf:ER細胞へのトランスフェクションは、LipofectAMINEおよびLipofectAMINE PLUSを用い、DNAは35 mmの培養皿1枚につき1.2 μg g使用した。

DNAコンストラクション

各コンストラクトには、既存のコンストラクトから制限酵素処理によりcDNA断片を切り出して別のベクターに組み換えたもの、既存のcDNAを鋳型として新たにPCR法で作製したもの、および野生型のcDNAにQuickchange site-directed mutagenesis kit (Stratagene)を用いて変異を導入し、全く新たに作製したものがある。後者二つについてはDNA配列を読むことにより、正しく変異が導入されているか、あるいは余計な変異が生じていないかを確認してある。なお、MKP-3の各コンストラクト(pMT-SM, pMT-SM MKP-3, pMT-SM MKP-3 CS)はDr. S.Arkininstallより、CL100のcDNAはDr. S.M.Keyseより、それぞれ御供与していただいた。また、RanのcDNA単離および変異導入は麻野四郎氏の協力による。

組み換えタンパク質の作製

Hisタグ付きアフリカツメガエルMAPK、Hisタグ付きアフリカツメガエル野生型およびNES変異型(LA)のMAPKKの各組み換えタンパク質は、それぞれGotohらおよびFukudaらの方法に準じて作製した(Gotoh et al., 1994; Fukuda et al., 1997a)。NES部位を変異させたアフリカツメガエルMAPKKの1-60番目までのアミノ酸残基のGST融合タンパク質(GST-KK 1-60 LA)もFukudaらの方法に準じて作製した(Fukuda et al., 1997a)。RanQ69LはGST融合タンパク質として大腸菌E.coli BL21株に、大腸菌発現ベクターpGEX-6P1-RanQ69Lより発現させた。大腸菌を37℃でOD₆₀₀=0.6まで培養し、次いで0.5 mM IPTGを加え25℃で6時間培養した。菌体の回収後、懸濁液(200 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄-KOH, pH7.0, 50 mM NaCl, 1 mM EGTA, 1 mM DTT, 0.1% Aprotinin, 1 μg/ml pepstatin A, 0.5 μg/ml leupeptin)に懸濁し、超音波による破碎を行った。15000 rpmで30分遠心後、上澄みに平衡化したglutathione-Sepharose 4B (Pharmacia)ビーズを加え、4℃で一夜混合し続けた。ビーズを懸濁液で洗浄後、PreScission Protease (Pharmacia)を加えプロテアーゼ阻害剤を除いた懸濁液と混合し、融合タンパク質からGSTを切り離した。懸濁液(切り放されたタンパク質が溶解している)に20 mM EDTA, 500 μM GTPγSを加え、氷上で2時間静置し、その後Ran微量注入用緩衝液(20 mM Hepes-KOH, pH7.4, 120 mM

KCl, 1 mM MgCl₂)で透析した。出来上がったRanQ69L-GTPγSは、Microcon-10 (Amicon)で濃縮し、分注後液体窒素で凍らせて-80℃で保存した。

謝辞

まず本研究を進めるにあたり、大学院在学中の五年間にわたって様々な面から御指導下さった西田栄介教授に深く感謝いたします。また直接私の指導に当たって下さり、多くの御助言を下さった福田真助手にも大変お世話になりました。特に入学当初はいろいろとお手数をお掛けしたことと思います。心より感謝いたします。森口徹生博士、増山典久博士、三嶋将紀博士には特に具体的な実験上の疑問に何度となく答えていただきました。与えて下さった助言はいつも適切で、多くの困難を乗り越えることができました。本当にありがとうございました。そして、同学年の仲間として五年間共に切磋琢磨してきた田ノ上拓二氏、花房洋氏、麻野四郎氏には多くのことを学ばせてもらいました。ありがとうございました。これからもよろしく願います。また西田研の諸先輩の方々、後輩の皆様にもいろいろなかたちでお世話になりました。この場を借りてお礼申し上げます。

参考文献

Acharya, U., Mallabiabarrena, A., Acharya, J.K. and Malhotra, V. (1998) Signaling via mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) is required for Golgi fragmentation during mitosis. *Cell*, 92, 183-192.

Ahn, N.G., Seger, R., Bratlien, R.L., Diltz, C.D., Tonks, N.K. and Krebs, E.G. (1991) Multiple components in an epidermal growth factor-stimulated protein kinase cascade. In vitro activation of a myelin basic protein/microtubule associated protein 2 kinase. *J. Biol. Chem.*, 266, 4220-4227.

Akashi, M. and Nishida, E. (2000) Involvement of the MAP kinase cascade in resetting of the mammalian circadian clock. *Genes Dev.*, 14, 645-649.

Alessi, D.R., Smythe, C. and Keyse, S.M. (1993) The human CL100 gene encodes a Tyr/Thr-protein phosphatase which potently and specifically inactivates MAP kinase and suppresses its activation by oncogenic ras in *Xenopus* oocyte extracts. *Oncogene*, 8, 2015-2020.

Alessi, D.R., Saito, Y., Campbell, D.G., Cohen, P., Sithanandam, G., Rapp, U., Ashworth, A., Marshall, C.J. and Cowley, S. (1994) Identification of the sites in MAP kinase kinase-1 phosphorylated by p74raf-1. *EMBO J.*, 13, 1610-1619.

Bardwell, L., Cook, J.G., Chang, E.C., Cairns, B.R. and Thorner, J. (1996) Signaling in the yeast pheromone response pathway: specific and high-affinity interaction of the mitogen-activated protein (MAP) kinases Kss1 and Fus3 with the upstream MAP kinase kinase Ste7. *Mol. Cell. Biol.*, 16, 3637-3650.

Biggs 3rd, W.H., Zavitz, K.H., Dickson, B., van der Straten, A., Brunner, D., Hafen, E. and Zipursky, S.L. (1994) The *Drosophila* rolled locus encodes a MAP kinase required in the sevenless signal transduction pathway. *EMBO J.*, 13, 1628-1635.

Bischoff, F.R., Klebe, C., Kretschmer, J., Wittinghofer, A. and Ponstingl, H. (1994) RanGAP1 induces GTPase activity of nuclear Ras-related Ran. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 91, 2587-2591.

Blenis, J. (1993) Signal transduction via the MAP kinase: proceed at your own RSK. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 5889-5892.

Brondello, J.M., McKenzie, F.R., Sun, H., Tonks, N.K. and Pouyssegur, J. (1995) Constitutive MAP kinase phosphatase (MKP-1) expression blocks G1 specific gene transcription and S-phase entry in fibroblasts. *Oncogene*, 10, 1895-1904.

Canagarajah, B.J., Khokhlatchev, A., Cobb, M.H. and Goldsmith, E.J. (1997) Activation mechanism of the MAP kinase ERK2 by dual phosphorylation. *Cell*, 90, 859-869.

Chen, R.-H., Sarnecki, C. and Blenis, J. (1992) Nuclear localization and regulation of erk- and rsk- encoded protein kinases. *Mol. Cell. Biol.*, 12, 915-927.

Cowley, S., Paterson, H., Kemp, P. and Marshall, C.J. (1994) Activation of MAP kinase kinase is necessary and sufficient for PC12 differentiation and for transformation of NIH 3T3 cells. *Cell*, 77, 841-852.

Davis, R.J. (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J. Biol. Chem.*, 268, 14553-14556.

Dent, P., Haser, W., Haystead, T.A., Vincent, L.A., Roberts, T.M. and Sturgill, T.W. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase kinase by v-Raf in NIH3T3 cells and in vitro. *Science*, 257, 1404-1407.

Dickmanns, A., Bischoff, F.R., Marshallsay, C., Lührmann, R., Ponstingl, H. and Fanning, E. (1996) The thermolability of nuclear protein import in tsBN2 cells is suppressed by microinjected Ran-GTP or Ran-GDP, but not by RanQ69L or RanT24N. *J. Cell Sci.*, 109, 1449-1457.

English, J.D. and Sweatt, J.D. (1996) Activation of p42 mitogen-activated protein kinase in hippocampal long term potentiation. *J. Biol. Chem.*, 271, 24329-24332.

Ferrigno, P., Posas, F., Koepp, D., Saito, H. and Silver, P.A. (1998) Regulated nucleo/cytoplasmic exchange of HOG1 MAPK requires the importin β homologs NMD5 and XPO1. *EMBO J.*, 17, 5606-5614.

Finlay, D.R., Newmeyer, D.D., Price, T.M. and Forbes, D.J. (1987) Inhibition of in vitro nuclear transport by a lectin that binds to nuclear pores. *J. Cell Biol.*, 104, 189-200.

Fischer, U., Huber, J., Boelens, W.C., Mattaj, I.W. and Luhrmann, R. (1995) The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell*, 82, 475-483.

Fornerod, M., Ohno, M., Yoshida, M. and Mattaj, I.W. (1997) CRM1 is an export receptor for leucine-rich nuclear export signals. *Cell*, 90, 1051-1060.

Fukuda, M., Gotoh, I., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1996) Cytoplasmic localization of MAP kinase kinase directed by its N-terminal, leucine-rich short amino acid sequence, which acts as a nuclear export signal. *J. Biol. Chem.*, 271, 20024-20028.

Fukuda, M., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1997a) Interaction of MAP kinase with MAP kinase kinase: its possible role in the control of nucleocytoplasmic transport of MAP kinase. *EMBO J.*, 16, 1901-1908.

Fukuda, M., Asano, S., Nakamura, T., Adachi, M., Yoshida, M., Yanagida, M. and Nishida, E. (1997b) CRM1 is responsible for intracellular transport mediated by the nuclear export signal. *Nature*, 390, 308-311.

Gaits, F., Degols, G., Shiozaki, K. and Russel, P. (1998) Phosphorylation and association with the transcription factor Atf1 regulate localization of Spc1/Sty1 stress-activated kinase in fission yeast. *Genes Dev.*, 12, 1464-1473.

Gavin, A.C. and Nebreda, A.R. (1999) A MAP kinase docking site is required for phosphorylation and activation of p90RSK/MAPKAPK-1. *Curr. Biol.*, 9, 281-284.

Gomez, N. and Cohen, P. (1991) Dissection of the protein kinase cascade by which nerve growth factor activates MAP kinases. *Nature*, 353, 170-173.

Gonzalez, F.A., Seth, A., Raden, D.L., Bowman, D.S., Fay, F.S. and Davis, R.J. (1993) Serum-induced translocation of mitogen-activated protein kinase to the cell surface ruffling membrane and the nucleus. *J. Cell Biol.*, 122, 1089-1101.

Gotoh, Y., Matsuda, S., Takenaka, K., Hattori, S., Iwamatsu, A., Ishikawa, M., Kosako, H. and Nishida, E. (1994) Characterization of recombinant *Xenopus* MAP kinase kinases mutated at potential phosphorylation sites. *Oncogene*, 9, 1891-1898.

Gotoh, Y., Masuyama, N., Suzuki, A., Ueno, N. and Nishida, E. (1995) Involvement of the MAP kinase cascade in *Xenopus* mesoderm induction. *EMBO J.*, 14, 2491-2498.

Hattori, S., Fukuda, M., Yamashita, T., Nakamura, S., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) Activation of mitogen-activated protein kinase and its activator by ras in intact cells and in a cell-free system. *J. Biol. Chem.*, 267, 20346-20351.

Hill, C.S. and Treisman, R. (1995) Transcriptional regulation by extracellular signals: mechanisms and specificity. *Cell*, 80, 199-211.

Hoshi, M., Nishida, E. and Sakai, H. (1988) Activation of a Ca^{2+} -inhibitable protein kinase that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro by growth factors, phorbol esters, and serum in quiescent cultured human fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 263, 5396-5401.

Howe, L.R., Leever, S.J., Gomez, N., Nakielnny, S., Cohen, P. and Marshall, C.J. (1992) Activation of the MAP kinase pathway by the protein kinase Raf. *Cell*, 71, 335-342.

Izaurrealde, E., Kutay, U., von Kobbe, C., Mattaj, J.W. and Görlich, D. (1997) The asymmetric distribution of the constituents of the Ran system is essential for transport into and out of the nucleus. *EMBO J.*, 16, 6535-6547.

Jaaro, H., Rubinfeld, H., Hanoch, T. and Seger, R. (1997) Nuclear translocation of mitogen-activated protein kinase kinase (MEK1) in response to mitogenic stimulation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA.*, 94, 3742-3747.

Jacobs, D., Glossip, D., Xing, H., Muslin, A.J. and Kornfeld, K. (1999) Multiple docking sites on substrate proteins form a modular system that mediates recognition by ERK MAP kinase. *Genes Dev.*, 13, 163-175.

Kato, S., Endoh, H., Masuhiro, Y., Kitamoto, T., Uchiyama, S., Sasaki, H., Masushige, S., Gotoh, Y., Nishida, E., Kawashima, H., Metzger, D. and Chambon, P. (1995) Activation of the estrogen receptor through phosphorylation by mitogen-activated protein kinase. *Science*, 270, 1491-1494.

Khokhlatchev, A.V., Canagarajah, B., Wilsbacher, J., Robinson, M., Atkinson, M., Goldsmith, E. and Cobb, M.H. (1998) Phosphorylation of the MAP kinase ERK2 promotes its homodimerization and nuclear translocation. *Cell*, 93, 605-615.

Kim-Kaneyama, J., Nose, K. and Shibamura, M. (2000) Significance of nuclear relocalization of ERK1/2 in reactivation of c-fos transcription and DNA synthesis in senescent fibroblasts. *J. Biol. Chem.*, 275, 20685-20692.

Klebe, C., Bischoff, F.R., Ponstingl, H. and Wittinghofer, A. (1995) Interaction of the nuclear GTP-binding protein Ran with its regulatory proteins RCC1 and RanGAP1. *Biochemistry*, 34, 639-647.

Koide, H., Satoh, T., Nakafuku, M. and Kaziro, Y. (1993) GTP-dependent association of Raf-1 with Ha-Ras: identification of Raf as a target downstream of Ras in mammalian cells. *Proc. Natl*

Acad. Sci. USA, 90, 8683-8686.

Kolch, W., Heidecker, G., Lloyd, P. and Rapp, U.R. (1991) Raf-1 protein kinase is required for growth of induced NIH/3T3 cells. *Nature*, 349, 426-428.

Kornhauser, J.M. and Greenberg, M.E. (1997) A kinase to remember: dual roles for MAP kinase in long-term memory. *Neuron*, 18, 839-842.

Kosako, H., Gotoh, Y., Matsuda, S., Ishikawa, M. and Nishida, E. (1992) Xenopus MAP kinase activator is a serine/threonine/tyrosine kinase activated by threonine phosphorylation. *EMBO J.*, 11, 2903-2908.

Kosako, H., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1994) Requirement for the MAP kinase kinase/MAP kinase cascade in Xenopus oocyte maturation. *EMBO J.*, 13, 2131-2138.

Kretschmar, M., Doody, J. and Massague, J. (1997) Opposing BMP and EGF signalling pathways converge on the TGF- β family mediator Smad1. *Nature*, 389, 618-622.

Kyriakis, J.M., App, H., Zhang, X.F., Banerjee, P., Brautigan, D.L., Rapp, U.R. and Avruch, J. (1992) Raf-1 activates MAP kinase-kinase. *Nature*, 358, 417-421.

Lackner, M.R., Kornfeld, K., Miller, L.M., Horvitz, H.R. and Kim, S.K. (1994) A MAP kinase homolog, mpk-1, is involved in ras-mediated induction of vulval cell fates in *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev.*, 8, 160-173.

Lackner, M.R. and Kim, S.K. (1998) Genetic analysis of the *Caenorhabditis elegans* MAP kinase gene mpk-1. *Genetics*, 150, 103-117.

Lavoie, J.N., L'Allemain, G., Brunet, A., Müller, R. and Pouyssegur, J. (1996) Cyclin D1 expression is regulated positively by the p42/44MAPK and negatively by the p38/HOGMAPK pathway. *J. Biol. Chem.*, 271, 20608-20616.

Leervers, S.J. and Marshall, C.J. (1992) Activation of extracellular signal-regulated kinase, ERK2, by p21ras oncoprotein. *EMBO J.*, 11, 569-574.

Lenormand, P., Sardet, C., Pages, G., L'Allemain, G., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1993) Growth factors induce nuclear translocation of MAP kinases (p42^{mapk} and p44^{mapk}) but not their activator MAP kinase kinase (p45^{mapkk}) in fibroblasts. *J. Cell Biol.*, 122, 1079-1088.

Lenormand, P., Brondello, J.M., Brunet, A. and Pouyssegur, J. (1998) Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J. Cell Biol.*, 142, 625-633.

Lewis, T.S., Shapiro, P.S. and Ahn, N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv. Cancer Res.*, 74, 49-139.

Marais, R., Wynne, J. and Treisman, R. (1993) The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. *Cell*, 73, 381-393.

Margolis, B., Silvennoinen, O., Comoglio, F., Roonprapunt, C., Skolnik, E., Ullrich, A. and Schlessinger, J. (1992) High-efficiency expression/cloning of epidermal growth factor-receptor-binding proteins with Src homology 2 domains. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 89, 8894-8898.

Marshall, C.J. (1994) MAP kinase kinase kinase, MAP kinase kinase and MAP kinase. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, 4, 82-89.

Marshall, C.J. (1995) Specificity of receptor tyrosine kinase signaling: transient versus sustained extracellular signal-regulated kinase activation. *Cell*, 80, 179-185.

Matsuda, S., Kosako, H., Takenaka, K., Moriyama, K., Sakai, H., Akiyama, T., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1992) Xenopus MAP kinase activator: identification and function as a key intermediate in the phosphorylation cascade. *EMBO J.*, 11, 973-982.

Moriguchi, T., Gotoh, Y. and Nishida, E. (1995) Activation of two isoforms of mitogen-activated protein kinase kinase in response to epidermal growth factor and nerve growth factor. *Eur. J. Biochem.*, 234, 32-38.

Muda, M., Boschert, U., Dickinson, R., Martinou, J.-C., Martinou, I., Camps, M., Schlegel, W. and Arkinstall, S. (1996) MKP-3, a novel cytosolic protein-tyrosine phosphatase that exemplifies a new class of mitogen-activated protein kinase phosphatase. *J. Biol. Chem.*, 271, 4319-4326.

Nakielnny, S., Cohen, P., Wu, J. and Sturgill, T. (1992) MAP kinase activator from insulin-stimulated skeletal muscle is a protein threonine/tyrosine kinase. *EMBO J.*, 11, 2123-2129.

Nigg, E. A. (1997) Nucleocytoplasmic transport: signals, mechanisms and regulation. *Nature*, 386, 779-787.

Nishida, E. and Gotoh, Y. (1993) The MAP kinase cascade is essential for diverse signal transduction pathways. *Trends Biochem. Sci.*, 18, 128-131.

Ossareh-Nazari, B., Bachelier, F. and Dargemont, C. (1997) Evidence for a role of CRM1 in signal-mediated nuclear protein export. *Science*, 278, 141-144.

Pages, G., Lenormand, P., L'Allemain, G., Chambard, J., Meloche, S. and Pouyssegur, J. (1993) Mitogen-activated protein kinases p42mapk and p44mapk are required for fibroblast proliferation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 90, 8319-8323.

Palacios, I., Weis, K., Klebe, C. and Dingwall, C. (1996) Ran/TC4 mutants identify a common requirement for snRNP and protein import into the nucleus. *J. Cell Biol.*, 133, 485-494.

Payne, D.M., Rossomando, A.J., Martino, P., Erickson, A.K., Her, J.-H., Shabanowitz, J., Hunt, D.F., Weber, M.J. and Sturgill, T.W. (1991) Identification of the regulatory phosphorylation sites in pp42/mitogen-activated protein kinase (MAP kinase). *EMBO J.*, 10, 885-892.

Posada, J. and Cooper, J.A. (1992) Requirements for phosphorylation of MAP kinase during meiosis in *Xenopus* oocytes. *Science*, 255, 212-215.

Pritchard, C.A., Samuels, M.L., Bosch, E. and McMahon, M. (1995) Conditionally oncogenic forms of the A-Raf and B-Raf protein kinases display different biological and biochemical properties in NIH 3T3 cells. *Mol. Cell. Biol.*, 15, 6430-6442.

Ray, L.B. and Sturgill, T.W. (1987) Rapid stimulation by insulin of a serine/threonine kinase in 3T3-L1 adipocytes that phosphorylates microtubule-associated protein 2 in vitro. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 84, 1502-1506.

Ren, M., Drivas, G., D'Eustachio, P. and Rush, M.G. (1993) Ran/TC4: a small nuclear GTP-binding protein that regulates DNA synthesis. *J. Cell Biol.*, 120, 313-323.

Robinson, M.J. and Cobb, M.H. (1997) Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 9, 180-186.

Schaeffer, H.J., Catling, A.D., Eblen, S.T., Collier, L.S., Krauss, A. and Weber, M.J. (1998) MP1: A MEK binding partner that enhances enzymatic activation of the MAP kinase cascade. *Science*, 281, 1668-1671.

Seeger, R., Ahn, N.G., Posada, J., Munar, E.S., Jensen, A.M., Cooper, J.A., Cobb, M.H. and Klebs, E.G. (1992) Purification and characterization of mitogen-activated protein kinase activator(s) from epidermal growth factor-stimulated A431 cells. *J. Biol. Chem.*, 267, 14373-14381.

Shapiro, P.S., Vaisberg, E., Hunt, A.J., Tolwinski, N.S., Whalen, A.M., McIntosh, J.R. and Ahn, N.G. (1998) Activation of the MKK/ERK pathway during somatic cell mitosis: direct interactions of active ERK with kinetochores and regulation of the mitotic 3F3/2 phosphoantigen. *J. Cell Biol.*, 142, 1533-1545.

Simon, M.A., Bowtell, D.D., Dodson, G.S., Lavery, T.R. and Rubin, G.M. (1991) Ras1 and a putative guanine nucleotide exchange factor perform crucial steps in signaling by the sevenless protein tyrosine kinase. *Cell*, 67, 701-716.

Smith, J.A., Poteet-Smith, C.E., Malarkey, K. and Sturgill, T.W. (1999) Identification of an extracellular signal-regulated kinase (ERK) docking site in ribosomal S6 kinase, a sequence critical for activation by ERK in vivo. *J. Biol. Chem.*, 274, 2893-2898.

Sturgill, T.W. and Wu, J. (1991) Recent progress in characterization of protein kinase cascade for phosphorylation of ribosomal protein S6. *Biochim. Biophys. Acta*, 1092, 350-357.

Tan, P.B., Lackner, M.R. and Kim, S.K. (1998) MAP kinase signaling specificity mediated by the LIN-1 Ets/LIN-31 WH transcription factor complex during *C. elegans* vulval induction. *Cell*, 93, 569-580.

Thomas, G. (1992) MAP kinase by any other name smells just as sweet. *Cell*, 68, 1-4.

Tolwinski, N.S., Shapiro, P.S., Goueli, S. and Ahn, N.G. (1999) Nuclear localization of mitogen-activated protein kinase kinase (MKK1) is promoted by serum stimulation and G2-M progression. Requirement for phosphorylation at the activation lip and signaling downstream of MKK. *J. Biol. Chem.*, 274, 6168-6174.

Traverse, S., Seedorf, K., Paterson, H., Marshall, C.J., Cohen, P. and Ullrich, A. (1994) EGF triggers neuronal differentiation of PC12 cells that overexpress the EGF receptor. *Curr. Biol.*, 4, 694-701.

Wolff, B., Sanglier, J.J. and Wang, Y. (1997) Leptomycin B is an inhibitor of nuclear export: inhibition of nucleo-cytoplasmic translocation of the human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) Rev protein and Rev-dependent mRNA. *Chem. Biol.*, 4, 139-147.

Wu, Y. and Han, M. (1994) Suppression of activated Let-60 Ras protein defines a role of *Caenorhabditis elegans* Sur-1 MAP kinase in vulval differentiation. *Genes Dev.*, 8, 147-159.

Xia, Z., Dickens, M., Raingeaud, J., Davis, R.J. and Greenberg, M.E. (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*, 270, 1326-1331.

Yang, S.H., Whitmarsh, A.J., Davis, R.J. and Sharrocks, A.D. (1998) Differential targeting of MAP kinases to the ETS-domain transcription factor Elk-1. *EMBO J.*, 17, 1740-1749.

Yoneda, Y., Imamoto-Sonobe, N., Yamaizumi, M. and Uchida, T. (1987) Reversible inhibition of protein import into the nucleus by wheat germ agglutinin injected into cultured cells. *Exp. Cell Res.*, 173, 586-595.

Zecevic, M., Catling, A.D., Eblen, S.T., Renzi, L., Hittle, J.C., Yen, T.J., Gorbsky, G.J. and Weber, M.J. (1998) Active MAP kinase in mitosis: localization at kinetochores and association with the motor protein CENP-E. *J. Cell Biol.*, 142, 1547-1558.

Zhang, X.F., Settleman, J., Kyriakis, J.M., Takeuchi-Suzuki, E., Elledge, S.J., Marshall, M.S., Bruder, J.T., Rapp, U.R. and Avruch, J. (1993) Normal and oncogenic p21ras proteins bind to the amino-terminal regulatory domain of c-Raf-1. *Nature*, 364, 308-313.

Zheng, C.-F. and Guan, K.L. (1994) Cytoplasmic localization of the mitogen-activated protein kinase activator MEK. *J. Biol. Chem.*, 269, 19947-19952.